

München, 1960.

Die Reinigung der β -Methyl-Crotonyl-Carboxylase
und der Serinsulphhydrase unter Anwendung
neuerer Methoden der Proteinchromatographie

von

ECKEHARD LORCH

München 1960

Die Reinigung der β -Methyl-Crotonyl-Carboxylase und
der Serinsulphydrase unter Anwendung neuerer
Methoden der Proteinchromatographie

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Eckehard Lorch
aus
München

Juni 1960

Berichterstatter: Prof. Dr. F. L y n e n

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 1960

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von
Mai 1958 bis April 1960 am Max-Planck-Institut
in München ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer

Herrn Prof. Dr. F. L y n e n

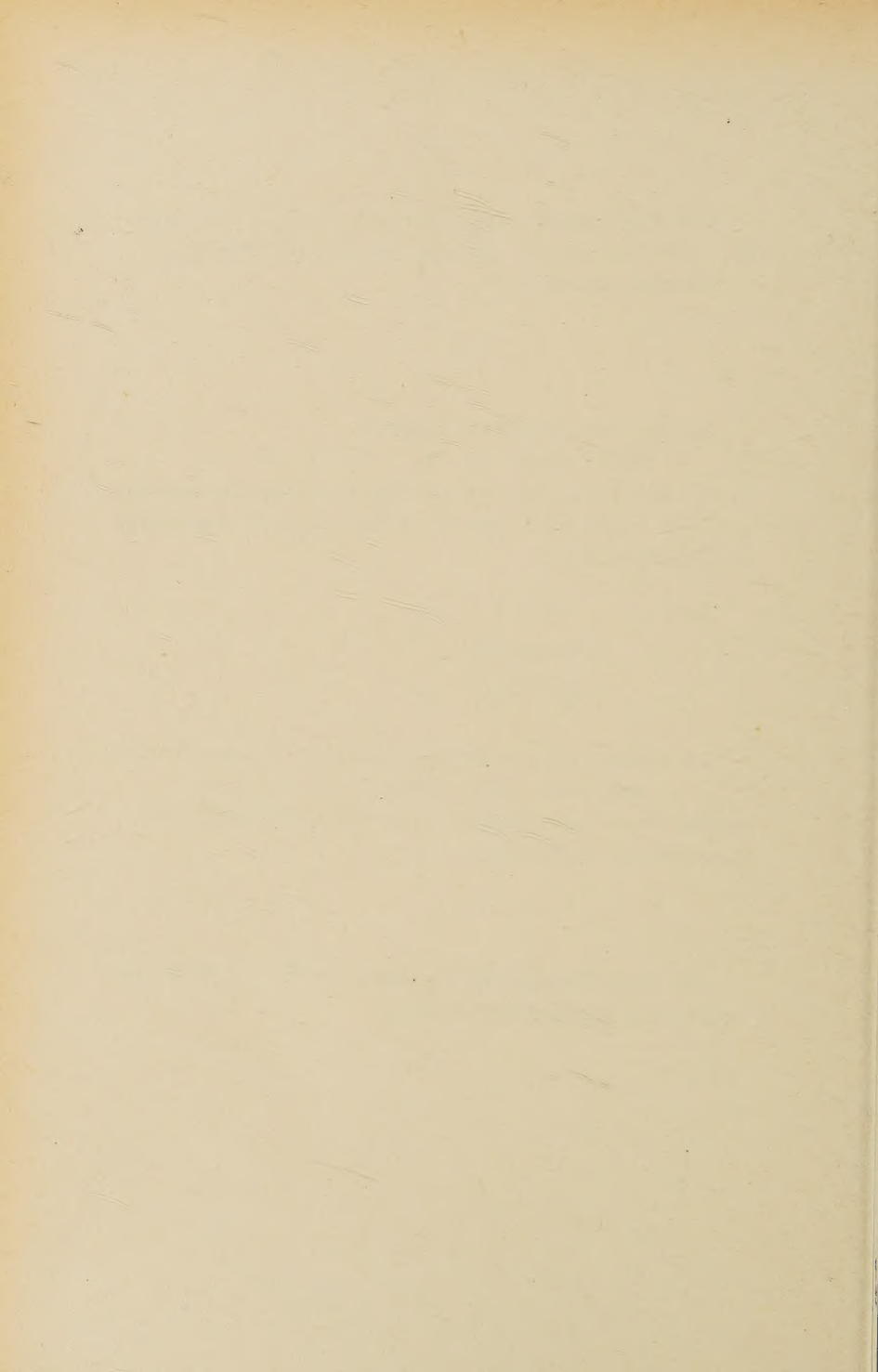
danke ich herzlich für die stets neuen Anregungen
und das Interesse, das er meiner Arbeit jederzeit
entgegenbrachte.

An dieser Stelle möchte ich auch meinem Freund

Herrn Dr. med. Gerd J ü t t i n g

meinen Dank aussprechen für seine unermüdliche,
aufopfernde Mitarbeit.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die
Gewährung eines Stipendiums.



Inhaltsverzeichnis

=====

	Seite
A. Einführung	1
B. Ergebnisse	5
I. Reinigung der β -Methyl-Crotonyl-Carboxylase	5
1. Enzymtest	5
a) Der p-Nitroanilin-Test	5
b) Der ADP-Test	6
c) Definition der Enzymeinheit	7
2. Ausgangsmaterial	9
3. Instabilität der Enzymlösungen beim 2. und 3. Ansatz	14
4. Reinigungsverfahren zur Gewinnung der β -Methyl-Crotonyl-Carboxylase aus Mycobacterium spp, wie es beim 1. Ansatz ausgearbeitet wurde	18
5. Reinigungsverfahren zur Isolierung der β -Methyl-Crotonyl-Carboxylase aus einem Pseudomonas-Stamm des Rinderpansens	29
6. Einige Eigenschaften des reinsten Enzympräparates aus Pseudomonas	32
7. Elektrophorese im Dichtegradienten	35
8. Einige Versuche mit anderen Cellulosederivaten	47
a) Ecteola-Cellulose	47
b) Carboxy-Methyl-Cellulose	49
c) Triäthylaminäthyl-Cellulose	49

	Seite
II. Biotingehalt der β -MC-Carboxylase und die biochemische Funktion des Biotins bei der Katalyse der CO ₂ -Fixierung durch β -Methyl- Crotonyl-Coenzym A	50
III. Untersuchungen an der Serinsulphydrase	55
1. Enzymtest	55
2. Reinigungsverfahren für Serinsulphydrase aus Bierhefe	55
3. Die weitere Anreicherung	56
4. Quantitative Bestimmungsmethoden	58
5. Gleichgewichtsmessungen	59
a) Versuche zur Erreichung des Gleich- gewichtszustandes von der Serin- seite	59
b) Versuche zur Ermittlung des Gleich- gewichtes von der Cysteinseite	60
c) Vorläufige experimentelle Befunde und ihre Deutung	63
C. Experimenteller Teil	65
I. Das β -Methyl-Crotonyl-CoA-carboxylierende Enzym	65
1. Substrate und Hilfsenzyme	65
2. Optische Enzymbestimmungen	65
3. Proteinbestimmungen	66
4. Ausgangsmaterial	67
a) Mycobacterium spp	67
b) Pseudomonas aus Kinderpansen	68
5. Aufschluß der Bakterienzellen	69

	Seite
6. Reinigung der β -Methyl-Crotonyl-Carboxylase	71
a) Mycobacterium spp als Ausgangsmaterial	71
b) Pseudomonas aus Rinderpansen als Ausgangsmaterial	74
7. Methodische Einzelheiten beim Arbeiten mit DEAE-Cellulose	75
8. Abgeändertes Reinigungsverfahren für β -Methyl-Crotonyl-Carboxylase aus Mycobacterium spp beim 2. Ansatz	77
9. Versuche zur Elektrophorese im Dichtegradienten	80
a) Beschreibung des Versuchsablaufes	81
b) Beschreibung der Versuche	84
II. Die Serinsulphydrase	89
1. Enzymtest	89
2. Anreicherung	89
3. Untersuchung der Gleichgewichtslage der Reaktion Serin + SH' = Cystein + OH'	97
a) Quantitative Bestimmung von Schwefelwasserstoff	97
b) Ausführung der Gleichgewichtsmessungen	99
D. Zusammenfassung	103
Literaturverzeichnis	106

Folgende Abkürzungen erscheinen im Text:

ATP, ADP	= Adenosintriphosphat bzw. -diphosphat
β -MG-CoA	= β -Methyl-Crotonyl-Coenzym A
β -MG-CoA	= β -Methyl-Glutaconyl-Coenzym A
HMG-CoA	= β -Hydroxy- β -Methyl-Glutaryl-Coenzym A
CoA, CoASH	= Coenzym A
CM-Cellulose	= Carboxymethyl-Cellulose
DEAE-Cellulose	= Diäthylaminäthyl-Cellulose
DPN ⁺	= Diphosphopyridin-nucleotid
DPNH	= reduziertes Diphosphopyridin-nucleotid
PEP	= Phosphoenolpyruvat
p-NA	= p-Nitroanilin
P _{ortho}	= Orthophosphat
Trilon B	= Äthylendiamin-tetraacetat
Tris/HCl	= Puffer aus Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und HCl
TRAM/HCl	= Puffer aus Triäthanolamin und HCl
TEAE-Cellulose	= Triäthylaminäthyl-Cellulose

A. Einführung

=====

Die moderne Biochemie sieht sich immer wieder vor die Aufgabe gestellt, Enzyme zu isolieren, deren Anteil am Gesamtprotein des Ausgangsmaterials nur einen verschwindend kleinen Bruchteil beträgt, bei deren Isolierung man daher mit Rücksicht auf brauchbare Ausbeuten besonders leistungsfähiger Methoden bedarf. Mit den systematischen Arbeiten des Kreises um TISELIUS, in dem neben elektrophoretischen Verfahren - in neuerer Zeit wurde von der Elektrophorese in einem Dichtegradienten berichtet¹⁾⁻⁵⁾ - die Chromatographie an verschieden modifizierten Ca-Phosphaten entwickelt wurde⁶⁾⁻¹¹⁾ sowie mit den, von SOBER und PETERSON erstmalig hergestellten Ionenaustauschern auf Cellulosebasis¹²⁾⁻¹⁶⁾, sind uns erste wirksame Mittel zur Bearbeitung solcher Probleme an die Hand gegeben.

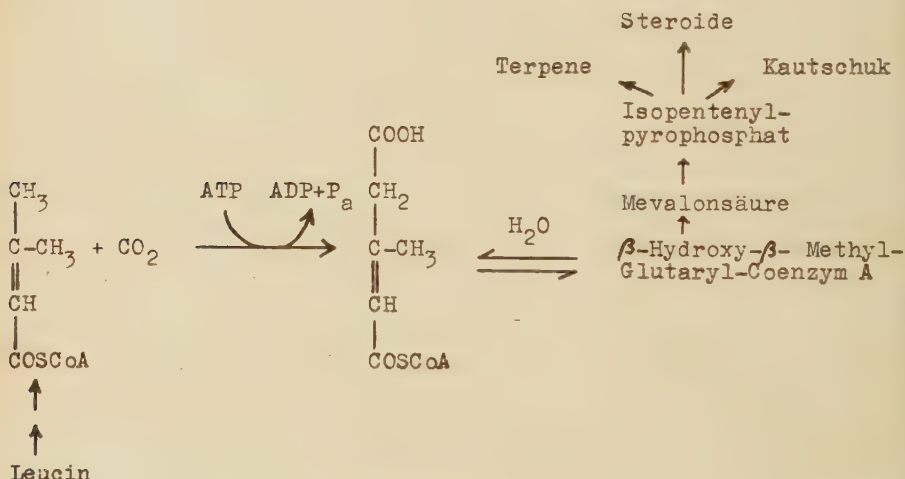
DEAE (Diäthylaminäthyl-) Cellulose fand bei der Anreicherung der von SCHLOSSMANN¹⁷⁾ entdeckten Serinsulphydrase aus Bierhefe erfolgreiche Anwendung¹⁸⁾. Dieses Enzym katalysiert in Sulfat-verwertenden Organismen den Einbau anorganischen Sulfid-Schwefels in die Aminosäure Serin nach der Gleichung



Die Gleichgewichtslage der Reaktion war unbekannt und erste Versuche, mit Enzympräparaten aus Bierhefe die Einstellung des Gleichgewichtes zu beschleunigen, stellten, wegen der viel zu geringen Umsatzrate, die Forderung nach noch aktiveren Serinsulphydrase-Fractionen. Damit war die Frage nach weiteren effektvollen Reinigungsoperationen aufgeworfen.

Inzwischen war aber ein anderes Enzym in den Brennpunkt des Interesses gerückt. Es handelte sich um die, von KNAPPE¹⁹⁾ in Leber- und Bakterienextrakten nachgewiesene

und etwa 8fach angereicherte Carboxylase, die auf dem Wege des Leucin-Abbaues die CO_2 -Fixierung durch β -Methyl-Crotonyl-Coenzym A katalysiert. Dabei entsteht β -Methyl-Glutaconyl-Coenzym A, das schließlich, nach enzymatischer Wasseranlagerung in β -Hydroxy- β -Methyl-Glutaryl-Coenzym A übergeht.



In dieser Reaktion lag ein sehr geeignetes Studienobjekt für den biochemischen Reaktionstyp der CO_2 -Fixierung und -Abspaltung vor. Die neuartige Carboxylierung des C_5 - β -Methyl-Crotonyl-CoA zum C_6 - β -Methyl-Glutaconyl-CoA geht mit einer Spaltung von ATP in ADP und anorganisches Phosphat parallel. Die Reaktion steht in enger Analogie zu der bereits bekannten Carboxylierung von Propionyl-CoA zu Methyl-Malonyl-CoA²⁰⁾²¹⁾ und von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA²²⁾²³⁾²⁴⁾. Hier wird die α -ständige Methylengruppe durch die Thioesterfunktion, beim β -Methyl-Crotonyl-CoA die γ -ständige Methylgruppe über eine, zur Thioesterbindung konjugierte, Doppelbindung in den reaktionsbereiten Zustand versetzt.

Der Mechanismus der Aktivierung des reaktionsträgen CO_2 oder HCO_3^- -Partners²⁵⁾ war bisher jedoch unklar. Sowohl das von OCHOA vorgeschlagene, enzymgebundene aktive Kohlensäurephosphat²⁶⁾ als auch die COON'sche Formulierung eines intermediär auftretenden Kohlensäure-Adenylates²⁷⁾²⁸⁾ war experimentell nicht genügend untermauert.

Die Anregung, nach einer Beteiligung des Vitamin H an der Carboxylierung zu suchen, kam aus den Ergebnissen der Wuchsstoff-Forschung. KÖGL²⁹⁾³⁰⁾ hatte aus Eigelb einen thermostabilen Wachstumsfaktor für Hefezellen isoliert, den er Biotin nannte. Später erwies sich durch die Untersuchungen von GYÖRGY, MELVILLE, BURK und DU VIGNEAUD³¹⁾ die Identität von Biotin und Vitamin H, das aus Leber oder Hefe gewonnen, die Symptome einer ekzemartigen Dermatitis an Ratten, denen als einzige Aminosäurequelle rohes Hühnereiweiß verabreicht worden war, zum Verschwinden bringt. EAKIN, SNELL und WILLIAMS³²⁾ zeigten, daß die Toxizität des Hühnereiweißes auf seinem Gehalt an Avidin beruht, das mit Biotin einen stabilen, biologisch unwirksamen Komplex eingeht. Die Verfütterung von Hühnereiweiß als Proteinkomponente der Diät führt also zu einer typischen Biotin-Avitaminose.

Bald folgende Berichte über verminderte metabolische Fähigkeiten derartig biotinfrei ernährter höherer Tiere und Microorganismen betrafen in erster Linie Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen (ausführliche Literaturangaben siehe bei⁴⁴⁾). Die für das hier bearbeitete Problem wichtigsten Befunde kamen von PLAUT und LARDY³³⁾ sowie von J.E.FISCHER³⁴⁾. Die Autoren beobachteten an der Leber biotindefizienter Ratten eine herabgesetzte Inkorporation von C^{14}O_2 in Acetessigsäure und die Lebermitochondrien solcher Tiere katalysierten die Carboxylierung von Isovaleriansäure oder β -Methyl-Crotonsäure nicht mehr. Einen weiteren Anhaltspunkt bildeten die Resultate aus dem COON'schen Laboratorium³⁵⁾⁻³⁹⁾ wo der Leucinabbau bei biotinfrei gehaltenen Ratten wegen des Ausfalls der CO_2 -Fixierung als empfindlich gestört vor-

gefunden worden war. Damit war der Weg für die weiteren Arbeiten angezeigt.

Welche Rolle spielt das Biotin bei diesen Vorgängen?

Von den meisten anderen bekannten, wasserlöslichen Vitaminen konnte man in den letzten Jahrzehnten zeigen, daß sie Bestandteil der Wirkungsgruppen von Biokatalysatoren sind.

Das Vitamin H aber gehörte zu den wenigen Ausnahmen, bei denen eine solche Zuordnung noch nicht möglich war.

Übernimmt bei der Carboxylierung einer reaktionsfähigen Methylen- oder Methylgruppe vielleicht Biotin als Wirkungsgruppe der verantwortlichen Carboxylase die Aktivierung der Kohlensäure und wie kann man sich ein "aktives Carbonat" vorstellen? Eine wesentliche Voraussetzung für die Bearbeitung der gestellten Fragen waren möglichst reine Enzympräparate.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die β -Methyl-Crotonyl-Carboxylase anzureichern, wobei zunächst vor allem die Enzyme, die der weiteren Untersuchung störend im Wege standen, - das β -Hydroxy- β -Methyl-Glutarsäure-spaltende Enzym und ATP-hydrolysierende Enzyme - abzutrennen waren. Dann sollte die Reinigung weiter getrieben werden, damit das Ansteigen der Aktivität mit dem Biotingehalt verglichen werden konnte. Unter Heranziehung vor allem moderner Methoden der Proteintrennung sollten deren allgemeinere Verwendungsmöglichkeiten erschlossen werden.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde mit den hier gewonnenen Erfahrungen die weitere Reinigung der Serinsulphydrase in Angriff genommen, um mit aktiveren Präparaten eine Aussage über die Gleichgewichtslage der eingangs erwähnten Reaktion möglich zu machen.

B. E r g e b n i s s e

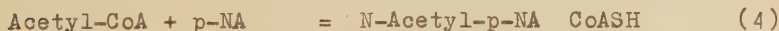
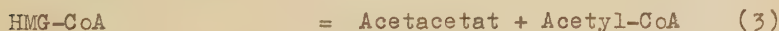
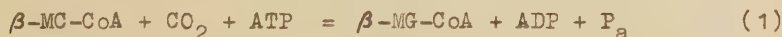
=====

I. Reinigung der β -MC-Carboxylase

1. Enzymtest

a) Der p-Nitroanilin-Test

Um die zu untersuchende Reaktion in einem zusammengesetzten optischen Test nach WARBURG verfolgen zu können, hatte KNAPPE¹⁹⁾ die Carboxylierung von β -MC-CoA mit der Acetylierung von p-NA gekoppelt:



Die Acetylierung von p-NA ist mit einer Abnahme der optischen Dichte bei 405 m μ verbunden. Gemessen wurde nach einer kurzen Induktionsperiode die lineare Extinktionsabnahme bei 405 m μ von der 5. bis 15. Minute. Als Routinetest leistete diese Art der Aktivitätsbestimmung wertvolle Dienste.

Zur Ermittlung der Aktivität des HMG-spaltenden Enzyms diente Reaktion (3) und (4). Mit HMG-CoA als Substrat wurde unter sonst gleichen Bedingungen $\Delta E_{405 \text{ m}\mu}$ von der 3. bis 8. Minute bestimmt.

b) Der ADP-Test

Um von den nur partiell gereinigten Hilfsenzymen Methylglutaconase (Reaktion 2), HMG-CoA-spaltendes Enzym (3) und Aryl-amin-Transacetylase (4) unabhängig zu werden, gelangte ein zweiter Test zur Anwendung, bei dem das während der CO₂-Fixierung gebildete ADP von Phosphoenolpyruvat phosphoryliert und dabei entstandenes Pyruvat mit DPNH zu Lactat reduziert wird:



Dieser Test hat gegenüber dem p-NA-Test den Vorteil, daß man mit weniger Hilfsenzymen auskommt, die zudem in reiner kristallisierter Form verfügbar sind (Pyruvatkinase (5) und Lactatdehydrogenase (6)). Die Bestimmung setzt allerdings Carboxylasepräparate voraus, deren Gehalt an ATP-hydrolysierenden Enzymen und DPNH-Oxydasen sehr gering ist.

Die Abnahme der Extinktion bei 366 m μ wurde über 5 Minuten verfolgt und daraus $\Delta E_{366 \text{ m}\mu} / 1 \text{ Minute}$ berechnet.

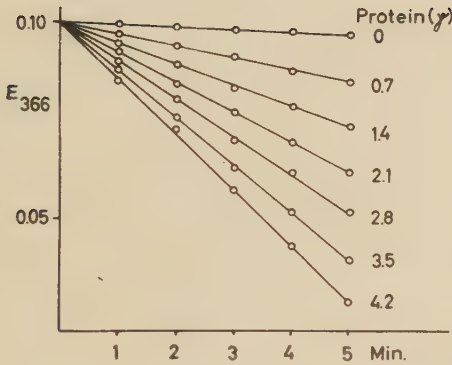


Abb.1: Enzymabhängigkeit

Testzusammensetzung: 280 μMol TRAM/HCl pH 7,4, 160 μMol KCl, 40 μMol MgSO_4 , 10 μMol KHCO_3 , 1 mg Serumalbumin (Behringwerke Marburg), 3, 1,35 μMol K-Phosphoenolpyruvat, 0,3 μMol DPNH, 1 μMol ATP, 40 γ Pyruvatkinase, 25 γ Lactatdehydrogenase (DPNH, ATP, PK und LDH: Boehringer & Söhne, Mannheim), 0,1 μMol β -MC-CoA, Carboxylasepräparat, Wasser.

Das Gesamtvolumen in der Küvette betrug 1,65 ml, $d = 1$ cm, $T = 20^\circ\text{C}$. Gemessen wurde gegen eine Vergleichsküvette ohne β -MC-CoA.

c) Definition der Enzymeinheit

Eine Vorstellung vom zeitlichen Substratumsatz wird durch Festlegung der Carboxylase-Aktivität auf molarer Basis gegeben. Auf diese Weise kann das Enzym mit anderen Enzymen, insbesondere dem HMG-spaltenden Enzym verglichen werden.

Einer Extinktionsänderung $\Delta E_{366 \text{ m}\mu} = 0,002$ im ADP-Test entspricht bei $d = 1$ cm und 20°C nach

$$\Delta c = \frac{\Delta E_{366 \text{ m}\mu} \cdot V}{\epsilon_{\text{DPNH}}}$$

Δc : Konzentrationsänderung des DPNH resp. β -MC-CoA.
 ΔE : Extinktionsänderung der DPNH-Bande bei 366 m μ
 V : Volumen des Testansatzes (1,65 ml)
 ϵ_{DPNH} : Molarer Extinktionskoeffizient von DPNH. ($3,3 \cdot 10^6 \frac{\text{cm}^2}{\text{Mol}}$)

ein Umsatz von

$$\Delta c = \frac{0,002 \cdot 1,65}{3,3} = 0,001 \mu\text{Mol } \beta\text{-MC-CoA/Minute}$$

Als 1 Enzymeinheit wird im Folgenden diejenige Menge Enzym definiert, die im optischen Test (ADP-Test, siehe Abb.1) eine Extinktionsabnahme $\Delta E_{366 \text{ m}\mu} = 0,002$ bewirkt, d.h. die unter den gewählten Bedingungen in 1 Minute 1 μMol β -MC-CoA umsetzt. Im p-NA-Test bedeutet ein $\Delta E_{405 \text{ m}\mu} = 0,002/10$ Minuten bei gleichem Testvolumen und gleicher Temperatur mit $\epsilon_{\text{p-NA}} = 10,1 \times 10^6 \left(\frac{\text{cm}^2}{\text{Mol}}\right)$ einen Substratumsatz von

$$\Delta c = \frac{0,0002 \cdot 1,65}{10,1} = 3,27 \cdot 10^{-5} \mu\text{Mol /Minute}$$

Der Umrechnungsfaktor von Einheiten des p-NA-Testes in Einheiten des ADP-Testes beträgt damit

$$\frac{3,27 \cdot 10^{-5}}{0,001} = 3,27 \cdot 10^{-2}$$

Die spezifische Aktivität wird angegeben in

$$\frac{\mu\text{Mol Substrat} / 1 \text{ Minute}}{1 \text{ mg Enzym}}$$

2. Ausgangsmaterial

Die Überlegenheit eines adaptierten Microorganismus gegenüber Leber- und Herzextrakten hatte KNAPPE im Verlauf seiner Untersuchung festgestellt¹⁹⁾. Hier wurde daher zunächst das seinerzeit von H.G.SCHLEGEL aus dem Wurzelbereich von *Valeriana officinalis* isolierte und identifizierte *Mycobacterium* spp verwendet. Ein ebenfalls von SCHLEGEL isolierter *Pseudomonas*stamm aus Rinderpansen erwies sich später jedoch als geeigneter (siehe Abschn.5). Beide Microorganismen decken ihren Energiebedarf aus der Oxydation von Isovaleriansäure, die neben CO₂ als einzige Kohlenstoffquelle angeboten wird. Die Fähigkeit zur Carboxylierung von β -MC-CoA ist daher in besonders hohem Ausmaß entwickelt, wie die 50 - 100 mal höhere Aktivität der Bakterienextrakte gegenüber Organextrakten bewies.

Wir beschäftigten uns zunächst damit, die Zuchtbedingungen für *Mycobacterium* spp zu finden, die in kürzester Zeit optimale Ausbeuten an Zellmasse ergaben. (Abb. 2)

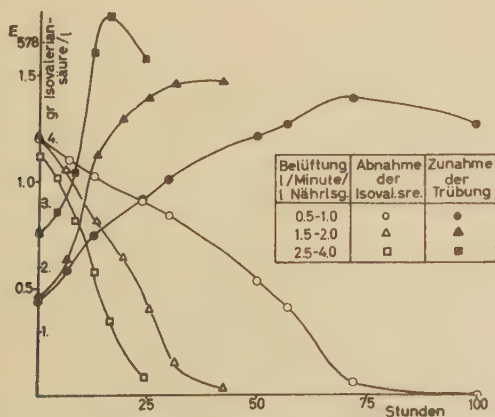


Abb. 2

Der Einfluß der Belüftungsintensität war besonders ausgeprägt, während die Beigabe von CO_2 beim Durchlüften des flüssigen Nährmediums unnötig war. Es zeigte sich, daß mit 5-Liter-Zuchtfラスchen und am Luftaustritt kreuzförmigen, mit 4 Öffnungen versehenen Belüftungsrohren, die ein kräftiges Durchstrudeln der Medien mit Luft ermöglichten, eine Beendigung des logarithmischen Wachstums schon nach 16 - 20 Stunden erzielt werden kann. Die Extrakte aus Bakterien, die auf diesem Wege gewonnen waren, wiesen zudem eine 2 - 3fach höhere Aktivität auf als die im Verlaufe von 40 oder 80 Stunden bei entsprechend geringerer Belüftung gewachsenen oder nicht mehr in der logarithmischen Phase geernteten, ausgewachsenen Zellen.

Für die Bakterienzucht im Großen wählten wir daher an Stelle eines 50-Liter-Ballons einen Satz von zehn 5-Liter-Flaschen, die parallel geschaltet, von einer Ölpumpe mit einer Leistung von 6 cbm Luft/Stunde versorgt wurden. Die ganze Anlage befand sich in einem Brutraum bei 31°C . Nach etwa 18 Stunden wurden die Flaschen abgeerntet, eine starke Kultur zur Beimpfung der nächsten 10, inzwischen sterilisierten Flaschen zurückbehalten.

Der Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte in 12-gr-Portionen im SCHLOSSMANN-Zellhomogenisator⁴⁰⁾. Mit einem probeweise zur Verfügung stehenden Ultraschallgerät konnte gezeigt werden, daß die Desintegration der Zellen mit demselben Ergebnis auch durch Ultraschall vorgenommen werden kann (Abb.3 siehe nächste Seite).

Das Verfahren würde bei kontinuierlicher Arbeitsweise den Aufschluß größerer Bakterienansätze wesentlich vereinfachen.

Wir arbeiteten mit einem Ultraschallgerät der Firma SCHOELLER & Co., Elektrochemische Fabrik, Frankfurt/Main, Type USIG 750 spezial (20 KHz, 750 Watt).

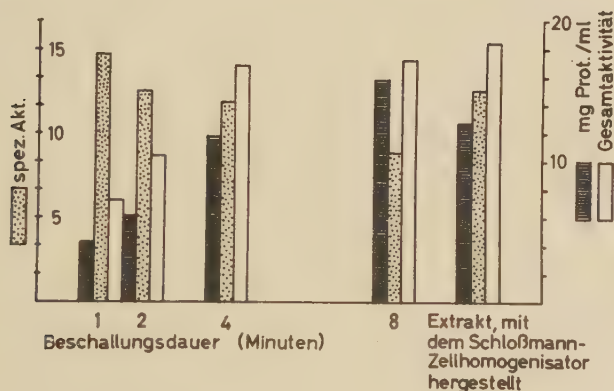


Abb. 3

Mit dem Extrakt der ersten insgesamt 900 gr des Mycobacterium spp arbeiteten wir ein Reinigungsschema für die β -MC-Carboxylase aus. Während erfahrungsgemäß die intakten, bei -15°C aufbewahrten Zellen in einem Monat 20-30% an Carboxylaseaktivität einbüßen, kann man die Lösung der 1. Ammonsulfatfällung einige Wochen praktisch ohne Verluste unter denselben Temperaturbedingungen als stabile Vorratsform ansammeln. Nach Beseitigung eines Großteils der Nucleinsäuren folgt eine 2. Ammonsulfatfällung und schließlich Chromatographie an DEAE-Cellulose und Hydroxylapatit (s.u.).

Beim Versuch der Übertragung des Verfahrens in den größeren Maßstab traten jedoch unerwartete Schwierigkeiten auf. Den größten Widerstand setzte die Gewinnung des geeigneten Ausgangsmaterials entgegen. Denn die nächste Charge von 500 gr des Mycobacterium spp, die wir aus einer der laufend

auf Agarschalen überimpften Generationsfolgen züchteten, produzierte während des Wachstums so große Mengen einer schleimigen Substanz, daß die Weiterverarbeitung unmöglich gemacht wurde. Die zähflüssigen Präparate verlegten die Säule bei der Chromatographie nach kurzer Zeit vollkommen und eine präparativ brauchbare Methode zur Abtrennung des Schleimes war wegen dessen hochmolekularer Natur nicht zu finden. Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich aber, daß die Schleimbildung vor allem bei frisch von der Kulturschale entnommenen, in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen, Organismen auftritt. Läßt man eine solche Kultur aber mindestens dreimal je 72 Stunden auswachsen, so erhält man schließlich Zellen, die man weiterzüchten kann, ohne daß dabei störende Mengen Schleimsubstanz anfallen. Beim nächsten Ansatz überlagerte sich die hohe Aktivität eines DPNH-Oxydase-Systems unserer Testreaktion. Wir gingen der Ursache dieser Erscheinung nicht weiter nach, da die folgenden Kulturen wieder die gewohnten Eigenschaften besaßen.

Der Alternativweg des "Großansatzes", die portionsweise Aufarbeitung kleinerer Bakterienmengen, war wegen der von Ansatz zu Ansatz stets schwankenden Eigenschaften nicht gangbar. Vor allem macht sich der ungleiche Nucleinsäuregehalt durch eine Verschiebung der Elutionsgrenzen bei der Chromatographie störend bemerkbar. Der einzige Ausweg bestand deshalb darin, zuerst eine größere Menge des Ausgangsmaterials auf der stabilen 1. Ammonsulfat-Stufe zu sammeln und, nach orientierenden Vorversuchen, die Gesamtmenge Schritt für Schritt der Reinigung zu unterwerfen. Zu diesem Zweck züchteten wir täglich 120-200 gr des *Mycobacterium* spp und arbeiteten die Extrakte gesondert auf. Nachdem in der Lösung der 1. Ammonsulfatfällung die Prüfung auf Aktivität, Schleimgehalt und DPNH-Oxydasen in allen Proben zufriedenstellend ausgefallen war, vereinigten wir das Protein aus insgesamt 4 kg Zellmasse, um zu einem einheitlichen Material für die folgenden Operationen zu gelangen. In 2 Portionen wurde die

Abtrennung der Nucleinsäuren und die 2. Ammonsulfatfraktionierung vorgenommen, wobei 83% der Enzymeinheiten der 1. Ammonsulfatfraktionierung wiedergewonnen werden konnten. Die spezifische Aktivität von 75 nahm aber nach wenigen Tagen Aufbewahrung bei -15°C um 20% ab. Versuche, die Ursache für die plötzlich auftretende Inaktivierung zu finden und, nachdem dies nicht gelang, die Abänderung des Reinigungsverfahrens sind im nächsten Abschnitt zusammengefaßt.

Wir schrieben die neuen Verhältnisse einer Degeneration der Bakterien im Verlaufe der mehrere Wochen beanspruchenden Großzucht zu. Die Infektion durch einen Fremdorganismus ist in Anbetracht des elektiven Mediums und der starken Impfkulturen wenig wahrscheinlich. An einem Verdünnungsausstrich auf Agar, der am Ende der Zuchtperiode vorgenommen wurde, waren keine neuen Kulturformen zu erkennen. Bemühungen, von Tochterkulturen des ersten Stammes wieder zu den alten Ergebnissen zu kommen, blieben ohne Erfolg. Nach Auswahl eines am geeignetsten erscheinenden Stammes und der Zucht von weiteren 2,8 kg Bakterien, sollte das Enzymprotein vor Abtrennung der Nucleinsäuren und vor der Behandlung mit DEAE stabilisiert werden. Halbwegs beständige Präparate waren jedoch nur mit Ausbeuten von weniger als 20% zu bekommen. Damit wurde aber die Verarbeitung so großer Zellmassen dieses Organismus hinfällig.

Tabelle 1

Ausbeuten bei den 3 Ansätzen auf der Vorratsstufe der 1. Ammonsulfatfällung

	Bakterienfrischgewicht (gr)	Protein (mg)	Enz.Einh. $\times 10^{-3}$	spez.Akt.
1. Ansatz	900	32 300	500	15,5
2. Ansatz	4 000	73 000	2 675	36,5
3. Ansatz	2 800	42 000	385	9,0

in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Reinigung der 4 Wochen eingefrorenen Proteinlösung vom 2. Ansatz

			Enz.Einh. $\times 10^{-3}$	%	spez. Akt.
Ausgangswerte:			2170	100	75,0
nach 4 Wochen:			1315	60	42,5
Verarbeitung in 9 annähernd gleichen Teilen:					
Nach der Reinigung an DEAE-Cellulose			Nach der Reinigung an Hydroxylapatit		
Enz.Einh. $\times 10^{-3}$	% ⁺⁾	spez.Akt.	Enz.Einh. $\times 10^{-3}$	% ⁺⁾	spez.Akt.
46,5	46	120	20,5	20	395
95,0	63	148	66,0	44	435
58,5	35	70	25,5	15	375
63,5	42	115	29,0	19	285
108,5	72	137,5	32,5	22	285
96,5	64	130	49,5	33	250
40,0	27	115	54,0	36	225
105,0	70	96	-	-	-
110,0	73	91	33,5	22	208
Ergebnis:					
725,0	55	113,5	310,0	23,5	307,5

+) bezogen auf den Wert nach 4 Wochen (= 100%).

Auf diese Weise konnten noch 12% der Enzymeinheiten der 1. Ammonsulfatfällung mit durchschnittlich 8,5facher Anreicherung gewonnen werden. Wie erwartet, waren diese Enzymlösungen etwas beständiger als vorher. Ein Experiment, die Vermutung zu erhärten, daß im Verlauf der Reinigung ein carboxylaseschädigender Faktor abgetrennt worden war, ist in Tabelle 3 dargestellt. Hierzu wurde eine Fraktion nach Hydroxylapatit (B) mit Protein (A) und Protein (C), das wir vor bzw. nach der Carboxylase von der DEAE-Cellulose eluiert hatten, inkubiert.

Tabelle 3

- Ansatz I. 0,8 mg B, 1,5 mg A, 2,3 mg C. Vol. 0,3 ml
NaCl 0,3 m, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,15 m, Tris/HCl 0,3 m.
- Ansatz II. 0,8 mg B, 3,8 mg Serumalbumin. Vol. 0,3 ml.
Salzkonzentration wie bei Ansatz I.

Enzymeinheiten / ml			
nach 0,5 Std. bei 0°C		nach 3 Std. bei 37°C	nach 24 Std. bei 0°C
Ansatz I	210	84	60
Ansatz II	200	148	123

In verdünnter Proteinlösung machte sich dieser Effekt praktisch nicht bemerkbar.

Versuche zur weiteren Anreicherung auf dem Wege einer Fraktionierung mit Alkohol, Chromatographie an Amberlite XE 64 ⁴¹⁾, Fällung mit Ammonsulfat oder mit Hilfe der präparativen Elektrophorese ergaben durchwegs unzureichende Resultate. Dagegen verlief die Säulenchromatographie an Hydroxylapatit zweier Präparate, die nach dem Gel-Adsorptionsverfahren an demselben Material vorgereinigt waren, bei einer 1,7 und 2,6fachen Anreicherung mit 62% Ausbeute.

Beim 3. Ansatz unternahmen wir zur Klärung der Frage nach der Unbeständigkeit der Lösungen einen ähnlichen Versuch wie oben (Tab.3). Wir bewahrten verschiedene Fraktionen der 2. Ammonsulfatfällung einzeln und zusammen über einen längeren Zeitraum bei 0°C auf:

Tabelle 4

Bezeichnung der Fraktionen und Sättigungsgrenzen	Enzym-Einheiten/ml nach				Aktivitätsabnahme (%)
	0	84	108	200	
	S t u n d e n:				
AS II a (0 -0,42)	34	--	--	--	
AS II b (0,42-0,46)	333	273	240	183	45
AS II c (0,46-0,50)	670	527	--	--	
AS II a + b + c	500	314	--	163	67

Es hatte wieder den Anschein, als ob ein Faktor der das Enzym inaktivierte, teilweise abgetrennt worden wäre. Die Fraktionen b und c verloren bei allen Versuchen zur Chromatographie an DEAE-Cellulose oder nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen immernoch stark an Aktivität. Da einige andere Messungen gegen die Verwendung von Mn^{++} sprachen, wurde Protaminsulfat zur Abtrennung der Nucleinsäuren verwendet, wonach die Verhältnisse sich jedoch nicht änderten. Wir schlossen daraus auf eine gewisse Schutzwirkung der Nucleinsäuren und versuchten vor deren Entfernung einen Stabilisierungsschritt einzuschalten. Die Fällung mit Zinkacetat mit und ohne Äthanol - zur Verminderung der Löslichkeit eines Zinkproteids - sowie die Alkoholfraktionierung mit und ohne zusätzliche Hefenucleinsäure⁴²⁾ hatte besonders hohe Verluste zur Folge. Die Adsorption an Al-C γ -Gel verlief zwischen pH 7,2 und 5,6 nicht spezifisch positiv oder negativ. Die Elution

ergab im günstigsten Fall 10-30% Ausbeute ohne Anreicherung. Bei der Fraktionierung mit gesättigter, saurer Ammonsulfatlösung⁴³⁾ fielen Niederschläge an, deren Aktivität mit steigender Ammonsulfatkonzentration und fallendem pH kontinuierlich abnahm. Die Verwendung von sec. K- oder NH_4 -Phosphat zum Aussalzen war ohne den gewünschten Effekt, den man von einer Salzfällung bei anderem pH erwarten kann. Schließlich gelang es, durch Adsorption an DEAE-Cellulose, die mit 0,01 m K_2HPO_4 äquilibriert war und Elution mit NaCl-haltigem 0,031 m K-Phosphatpuffer pH 6, die spez. Akt. in der Fraktion, die zwischen 0,154 m NaCl und 0,213 m NaCl eluiert wurde zu verdoppeln. (Auch bei Verwendung neuen, ungebrauchten Austauschers derselben DEAE-Charge, konnte die Ausbeute von 20% nicht verbessert werden).

Unter diesen Umständen schien es nicht lohnend, 38 gr Protein an DEAE-Säulen zu reinigen um aus 2,8 kg Bakterien, deren Extrakt von Anfang an weniger aktiv war, zum selben Ergebnis zu kommen, wie es aus 150 gr Zellmasse früher bereits nach der 1. Ammonsulfatfraktionierung erhalten worden war. Überdies reichte die Stabilität für die relativ langwierigen chromatographischen Verfahren immer noch nicht aus.

4. Reinigungsverfahren zur Gewinnung der β -MC-Carboxylase aus *Mycobacterium* spp, wie es beim ersten Ansatz ausgearbeitet wurde

Während der Aufarbeitung des Extraktes der ersten 900 gr des *Mycobacterium* spp traten die beschriebenen Unbeständigkeitserscheinungen nicht auf. Bei einer 170 - 180fachen Anreicherung konnten 36% der Aktivitätseinheiten wiedergewonnen werden. Die ermittelten Reinigungsschritte sind in Tabelle 5 (siehe nächste Seite) zusammengefaßt⁴⁴⁾.

Tabelle 5

Anreicherung der β -MC-Carboxylase aus *Mycobacterium* spp.
(100 gr Bakterien-Feuchtmasse)

	Protein (mg)	Enz.Einh. $\times 10^{-3}$	spez.Akt.	Aus- beute (%)
Extrakt	5 470	58,2	10,5	100
1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fraktionierung (0,25 - 0,60)	3 600	56,2	15,5	97
Überstand der MnCl_2 -Fällung	1 840	46,0	25,0	79
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fraktionierung (0,38 - 0,50)	660	43,9	65,0	75
Chromatographie an DEAE-Cell.	106	26,4	250,0	45
Chromatographie an Hydroxylapatit	11,5	21,2	1 850,0	36

Die 1. Ammonsulfatfraktionierung (0,25 - 0,60) dient zur Konzentrierung und, wie erwähnt, zur Stabilisierung des Bakterienproteins. Durch die Behandlung mit MnCl_2 wird ein Großteil der Nucleinsäuren entfernt⁴⁵⁾. Da jedoch die Enzymlösung vorher gegen Phosphatpuffer dialysiert wird, spielen hier möglicherweise Protein-Adsorptionserscheinungen an Manganphosphat eine Rolle bei der geringfügigen Anreicherung. Überschüssige Mn^{++} -Ionen wurden aus dem Überstand durch Zugabe von K-bicarbonat größtenteils entfernt. Nach einer 2. Ammonsulfatfraktionierung in engeren Grenzen (0,38 - 0,50) wurde eine konzentrierte Proteinlösung erhalten, die in gefrorenem Zustand haltbar genug war, damit im Verlaufe einiger Wochen die für die Chromatographie geeigneten Bedingungen gefunden werden konnten.

Die Adsorption des Proteins richtet sich nach dem Kapazitätsbereich des Ionenaustauschers, dem Ionisierungszustand des

Proteins und der Stabilität des untersuchten Enzyms gegenüber H^+ -Ionen. Im Falle der DEAE-Cellulose ist die Verwendung eines Kationenpuffers wie Trishydroxymethylaminomethan theoretisch sinnvoll, dessen Kapazität aber unterhalb pH 7,5 erschöpft ist. Da Kationenpuffer mit niedrigeren pK-Werten nicht zur Verfügung stehen und wir im Falle der β -MG-Carboxylase hinsichtlich der Beständigkeit auf dieser Reinheitsstufe bei pH 6 die günstigsten Erfahrungen gemacht hatten, verwendeten wir Phosphatpuffer.

Die Elution der einzelnen Proteinanteile kann durch schrittweise oder kontinuierliche Erhöhung der Ionenstärke bewirkt werden. Das kontinuierliche Verfahren ist nicht geeignet für den größeren Maßstab, da die einzelnen Gipfel flach anfallen, d.h. man erhält stark verdünnte Eiweißlösungen. Es leistet jedoch wertvolle Dienste im Vorversuch.

Im allgemeinen verschafften wir uns zunächst einen Überblick, indem wir eine kleine Säule (1 x 8 cm) - ihre Größe und Belastung richtet sich nach der Empfindlichkeit des Enzymtestes - etwa mit 20-30 mg Protein beschickten und Schritt für Schritt die Salzkonzentration erhöhten.

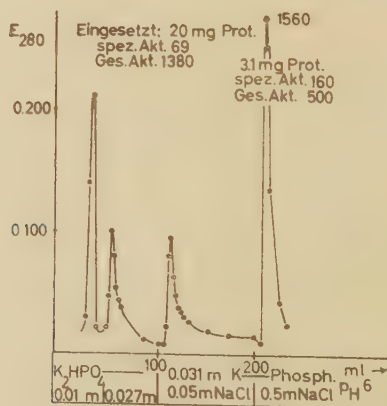


Abb. 5 Chromatographie an DEAE-Cellulose

War in einem der Proteingipfel Aktivität gefunden, so wurde im nächsten Versuch im fraglichen Bereich die Salzkonzentration kontinuierlich erhöht. An Hand der Beziehung

$$\frac{c_x}{c_z} = \frac{e^{\frac{v}{V}} - 1}{e^{\frac{v}{V}}} \quad (46)$$

konnte in den meisten Fällen (aus V = Vol. des Mischgefäßes, v = Volumen der entnommenen Flüssigkeit, c_z = Konz. der zulaufenden Lösung, c_x = Konz. der Lösung in der Mischkammer nachdem v zugelaufen ist) die richtige Konzentration berechnet werden, bei der die Elution des gewünschten Proteins gerade noch nicht beginnt. (Abb. 6)

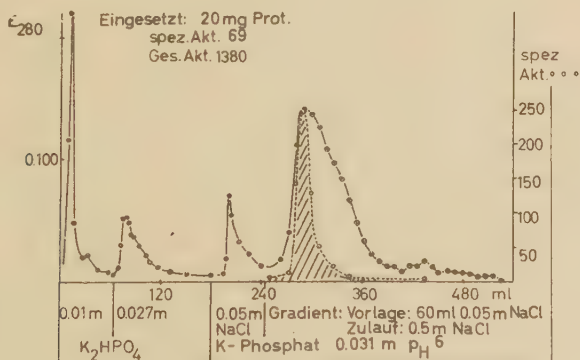


Abb. 6 Chromatographie an DEAE-Cellulose

Zur Gewinnung des Enzyms wählt man dann die am rückwärtigen Ende des Aktivitätsmaximums ermittelte Ionenkonzentration.

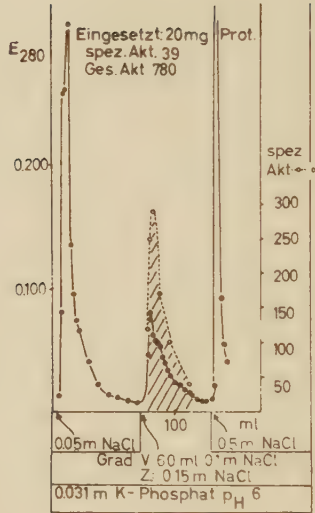


Abb. 7 Chromatographie an DEAE-Cellulose

Dasselbe Verfahren wandten wir bei der Chromatographie an Hydroxylapatit an.

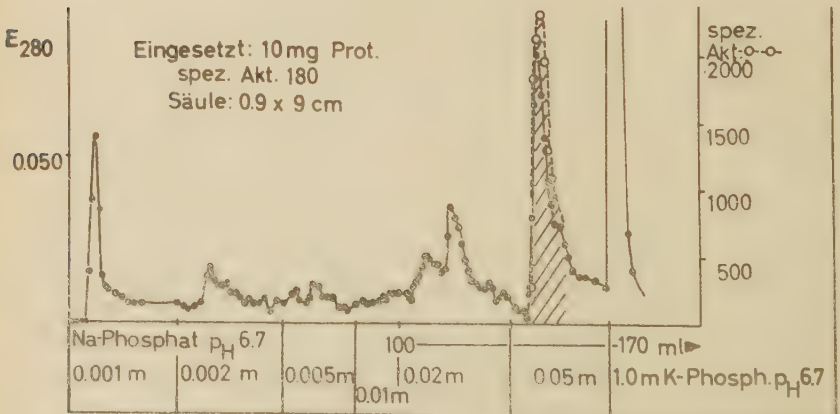


Abb. 8 Chromatographie an Hydroxylapatit

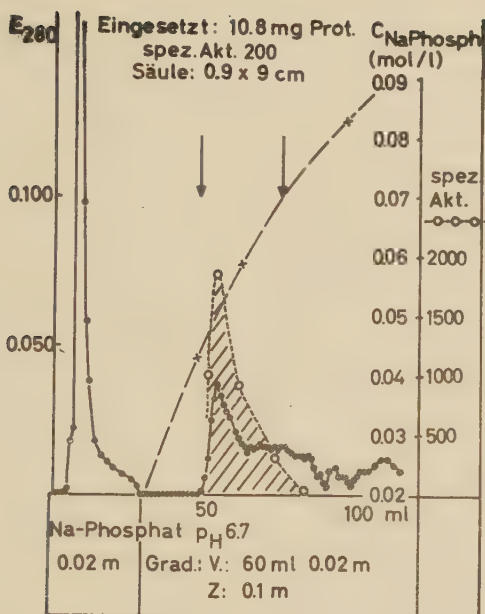


Abb. 9 Chromatographie an Hydroxylapatit

Die Zusammenfassung der vor dem Enzym eluierten inaktiven Fraktionen kann nicht in allen Fällen vorgenommen werden, da, handelt es sich um größere Mengen Protein, häufig die Erscheinung der gegenseitigen Verdrängung der ionisierten Eiweißmoleküle auftritt und aktives Protein frühzeitig ausgewaschen wird.

Die Eluatfraktionen bei solchen chromatographischen Verfahren weisen Proteinkonzentrationen von 0,1 - 1 mg/ml auf. In der Regel sind für weitere Operationen jedoch 5-20 mg/ml erforderlich und damit tritt das Problem der K o n z e n t r i e - r u n g auf. Die meisten Vorschläge hierzu sind jedoch für den präparativen Maßstab, in dem Volumina von 100 - 3000 ml auf etwa 1/20 eingeeengt werden müssen, nicht befriedigend. Die Fällung mit Aceton⁴⁷⁾ beispielsweise führt zu sehr großen Volumina. Dasselbe gilt für die Verwendung von gesättigter Ammonsulfatlösung. Zudem macht sich die endliche Löslichkeit

in gesättigter Lösung bei der großen Menge des Lösungsmittels stark bemerkbar. Festes Ammonsulfat verursacht beim Auflösen der Salzkristalle eine kräftige Bläschenbildung, die teilweise von eingeschlossenen Gasen herrührt und teilweise von der Herabsetzung der Löslichkeit der Gase, die die Proteinlösung enthält. An der Grenzfläche Gasphase-Flüssigkeit spielen sich dann Denaturierungsvorgänge ab, die zu großen Verlusten führen. Die Denaturierung läßt sich auch nicht vollständig vermeiden, wenn man mit gesättigter Lösung überschichtetes Ammonsulfat vorher im Vakuum sorgfältig entgast und die Suspension zur Fällung verwendet⁴⁸⁾. Die Dialyse gegen eine leichtlösliche, hochmolekulare Verbindung wie Polyvinylpyrrolidon ist gut geeignet für 10 - 50 ml⁴⁹⁾. Zur Bewältigung größerer Flüssigkeitsmengen ist Aufwand und Zeitverlust zu groß. Um 1180 ml einzuengen, dialysierten wir 40 Stunden gegen 1 Liter einer kräftig gerührten, wässrigen Lösung von 400 gr Periston (MG 25 000),⁺ lösten danach noch 150 gr Periston und erst nach weiteren 12 Stunden war ein Volumen von 150 ml erreicht. Offenbar werden auch die Dialysmembranen mit der Zeit poröser, denn in den letzten Stunden drang Periston in die Enzymlösung, von der es allerdings an DEAE-Cellulose als ungeladener Körper vom geladenen Enzymprotein wieder abgetrennt werden konnte.

Gut bewährte sich die Konzentrierung durch Adsorption an DEAE-Cellulose. Sie erfordert die Dialyse der gesamten verdünnten Proteinlösung, wobei man durch Ausschluß von Luftblasen die Schüttelinaktivierung verhindert (die Durchmischung besorgen große Glaskugeln). Anschließend wird das Protein auf einer kleinen DEAE-Säule (20 ml für 100 mg Protein) gesammelt und mit einem geeigneten Puffer hoher Konzentration als scharfe Zone eluiert.

Wir beschäftigten uns in diesem Zusammenhang eingehender damit, eine Möglichkeit zu finden, den Salzgehalt der Proteinlösung schon während des Ausflusses aus der Säule soweit herabzusetzen, daß eine erneute Adsorption an DEAE möglich ist.

+) Periston wurde uns von der Badischen Anilin und Sodafabrik zur Verfügung gestellt, wofür ich an dieser Stelle danken möchte.

Eine Vorrichtung hierzu bestand aus einem 16 mm starken, 30 cm langen Stab aus Polyvinylchlorid, in den nach Art eines Gewindes eine 1 mm tiefe, 3 mm breite Rinne eingeschnitten worden war. Über diesen Stab wurde ein eng anliegender Dialysierschlauch gezogen, in den in senkrechter Stellung die Proteinlösung einfloß. Durch die schraubenförmige Rinne wurde die Lösung auf ihrem Weg abwärts an der Dialysemembran vorbeigeführt während außen im Gegenstrom die Dialysierflüssigkeit vorbeistrich. Das Prinzip der Elektrodialyse⁵⁰⁾ versuchten wir mit einer anderen Apparatur. Hier wurde der Dialysierschlauch über eine 2 mm starke, 40 cm lange und 4 cm breite Plexiglasschablone gestreift, die in der Mitte eine rechteckige (38 x 2 cm) Aussparung besaß. Die Eiweißlösung trat an der einen schmalen Stirnseite durch feine Bohrungen ein, durchlief in 2 mm starker, 2 cm breiter Schicht die Aussparung zwischen beiden Membranen und trat nach einem Weg von 30 cm wieder durch feine Bohrungen an der anderen Stirnseite aus. Die Schablone war zwischen zwei passenden, 5 cm tiefe Plexiglaskammern gepreßt, durch die von unten nach oben im Gegenstrom Pufferlösung floß. An der Rückwand jeder der gegenüberliegenden Kammern befanden sich Platindrähte, die als Elektroden dienten. Wir arbeiteten bei 400-700 Volt.

Keines der beiden Verfahren brachte jedoch, vor allem in Bezug auf die benötigten Volumina an Dialysierflüssigkeit, einen entscheidenden Vorteil gegenüber der Dialyse nach KUNITZ⁵¹⁾, der wir uns dann ausschließlich bedienten.

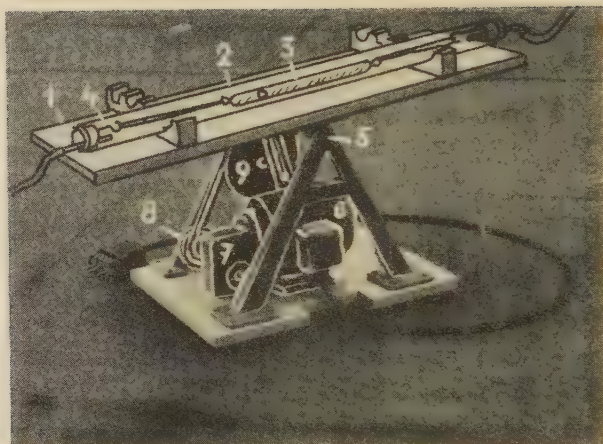


Abb.10

Der Auflagerost (1) dient zur Befestigung des durchströmten Glasrohres (2), in dem der Dialysierschlauch (3), der die Proteinlösung enthält, zwischen zwei Glashaken (4) an Gummischnüren ausgespannt ist. Der Rost (1) führt um die Achse (5) eine langsame Schaukelbewegung aus. Der Antrieb erfolgt durch den Motor (6), der über ein Schneckengetriebe (7) und eine für 3 Geschwindigkeiten einstellbare Keilriementransmission (8) die Kraft auf die Exzentrerscheibe (9) überträgt.

Im Gegensatz zum 2. und 3. Ansatz waren die Carboxylasepräparate nach Chromatographie an DEAE-Cellulose völlig stabil. Eine DEAE-Spitzenfraktion verlor, bei pH 6 und einer Proteinkonzentration von 0,15 mg/ml in 0,03 m K-Phosphat/0,15 m NaCl selbst nach mehreren Wochen bei 0°C praktisch nicht an Aktivität.

Das HMG-spaltende Enzym erscheint erst, wenn man, nach der Elution des Carboxylaseproteins, die Ionenstärke weiter erhöht.

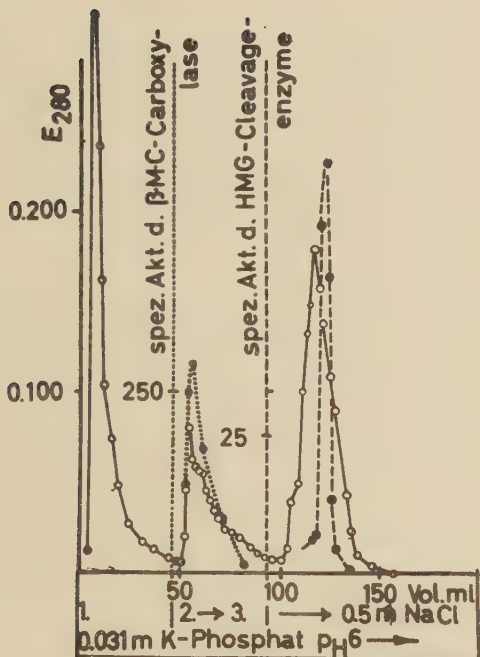


Abb. 11

Chromatographie
an DEAE-Cellulose

1. 0,05 m NaCl, 0,025 m KH_2PO_4 , 0,0057 m K_2HPO_4
2. Vorlage: 60 ml 0,1 m NaCl, ⁴Phosphat wie ¹.
3. Zulauf: 0,152 m NaCl, Phosphat wie 1.

Über die Wirksamkeit des chromatographischen Verfahrens bei der Trennung beider Enzyme gibt Tabelle 6 Auskunft.

Tabelle 6

Spalte 1 enthält die Bezeichnung der angeführten Präparate. "AS II b" bedeutet Carboxylasepräparat nach der 2. Ammonsulfatfraktionierung. Mit "SD" und fortlaufenden Indices versehen sind die Versuche an DEAE-Cellulose-. Die dahinter angegebenen Buchstaben A,B,C beziehen sich auf die einzelnen Proteingipfel des Chromatogramms. A = 1. inaktiver Gipfel. B = Carboxylase-Gipfel. C = Gipfel des HMG-spaltenden Enzyms. Die angefügten Ziffern geben die Fraktionsnummer an.

	a)		b)		
	β -MC-Carboxylase:		HMG-spaltendes Enzym: +)		spez. Akt a spez. Akt. b
Bezeichnung:	Enz. Einh.	spez. Akt.	Enz. Einh.	spez. Akt.	
AS II (0,44-0,48)	1300	130	150	15	8,7
AS II b (0,38 - 0,5)	590	73	1 080	133	0,55
AS II b (0,38 - 0,5)	8560	56	10 600	69	8,1
SD ₁ - B	5300	157	380	11,3	13,9
SD ₁ - C	1180	3,9	980	32,7	0,12
SD ₂ - B - 3	68	290	2	9	32,6
SD ₂ - C - 3	4	4	1,6	1,6	2,4
SD ₃ - B - 2	36	250	1,6	11,3	22
SD ₈ - B - 5	98	390	0,16	0,65	630

+) Als eine Enzymeinheit des HMG-spaltenden Enzyms ist ebenfalls $\Delta E_{405 \text{ m}\mu} = 0,002/10$ Minuten definiert (vergl. I., Abschn. 1) entsprechend einem Substratumsatz von 1 mMol HMG-CoA/Min.

Der eingerahmte Teil der Tabelle enthält das Ergebnis eines präparativen Versuches. Aus den folgenden Werten kann man entnehmen, daß einzelne Spitzenfraktionen praktisch kein HMG-spaltendes Enzym mehr enthalten. Nach Chromatographie an Hydroxylapatit war selbst wenn die carboxylaseaktiven Fraktionen bei präparativer Darstellung vereinigt wurden, keine HMG-CoA-Spaltung mehr nachzuweisen.

Auch der Gehalt an ATP-hydrolysierenden Enzymen war nach der Behandlung mit DEAE-Cellulose stark erniedrigt. Im ADP-Test betrug der Blindlauf in der Vergleichsküvette ohne Substrat als Folge der Anwesenheit von ATP-asen in Enzymlösungen der

2. Ammonsulfatfällung durchschnittlich 50% der gesamten Extinktionsabnahme, so daß die Aktivität mit Hilfe des p-NA-Testes gemessen werden mußte. Nach Chromatographie an DEAE-Cellulose war im Testansatz ohne β -MC-CoA nur noch 6% der Extinktionsänderung mit β -MC-CoA festzustellen. Selbst die reinsten Präparate enthielten jedoch noch Myokinase.

5. Reinigungsverfahren zur Isolierung der β -MC-Carboxylase aus einem Pseudomonasstamm des Rinderpansens

Die wiederholt erfolglosen Versuche zur Übertragung der beschriebenen Reinigungsoperationen in den großen Maßstab schreiben wir einer Degeneration unserer Kulturen des *Mycobacterium* spp zu. Nachdem die in Abschnitt 3 beschriebenen Versuche zur Stabilisierung der unbeständigen Enzymlösungen fehlgeschlagen waren, gingen wir zu einem anderen Microorganismus über. Herr Dr. SCHLEGEL hatte aus Rinderpansen einen nicht näher identifizierten *Pseudomonas*stamm isoliert und uns zuvorkommenderweise zur Verfügung gestellt. Das Nährmedium war nur geringfügig verändert (siehe Teil C).

Vorversuche mit 10 gr Proben des *Pseudomonas* erwiesen neben einer höheren spezifischen Aktivität der Zellextrakte eine ausgezeichnete Stabilität der Präparate. Die Züchtung in Massenkultur erfolgte hier in einem Behälter mit 200 l Fassungsvermögen. Durch eine geeignete Rührvorrichtung und den Einsatz eines Kompressors, der eine intensive Belüftung gewährleistete, wurde es möglich, in einem Gefäß eine befriedigende Zellausbeute zu erzielen (4- 5 gr Feuchtmasse/Liter Medium in 24 Std.). In 4 Ansätzen von je 160 Litern konnten so 2,7 kg Bakterienmasse gewonnen werden, die in 4 Portionen getrennt bei -17°C aufbewahrt wurden. Der Aufschluß der Zellen wurde in derselben Weise wie der des *Mycobacterium* im SCHLOSSMANN-Zellhomogenisator⁴⁰⁾ vor-

genommen.

Zur Auffindung des einzuschlagenden Reinigungsweges entnahmen wir den 4 Portionen in gefrorenem Zustand jeweils einen aliquoten Teil und vermischten diese vor der Verarbeitung.

Wie Tabelle 7 zeigt, konnte die Folge der Reinigungsschritte, die bei der Isolierung der β -MC-Carboxylase aus *Mycobacterium* spp entwickelt worden war, beibehalten werden. Es war nur erforderlich, andere Sättigungsgrenzen bei den Ammonsulfatfraktionierungen zu wählen; auch die Fraktionsgrenzen bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose mußten neu ermittelt werden (vergl. Abb.6 und 12).

Tabelle 7

Anreicherung der β -MC-Carboxylase aus einem *Pseudomonas*-Stamm des Rinderpanens (100 gr Bakterien-Feuchtmasse)

	Protein (mg)	Enzymeinh. $\times 10^{-3}$	spez.Akt.	Ausbeute (%)
Extrakt	2750	57,2	20,8	100
1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fraktionierung (0,38 - 0,62)	534	32,6	61,0	57
Überstand der MnCl_2 -Fällung	390	29,0	73,5	51
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fraktionierung (0 - 0,48)	110	18,0	163,5	31
Chromatographie an DEAE-Cellulose	12,9	9,0	700,0	15,7

Die Chromatographie an Hydroxylapatit war im alten Reinigungs-
gang eine sehr wirksame Methode. Hier führte sie
nicht zum Erfolg, denn bei der Elution enthielt jeder Pro-
teingipfel sowohl inaktives als auch aktives Protein in
einem Verhältnis, das keinen brauchbaren Gewinn an spez.
Aktivität bedeutete. Durch negative Adsorption an Al-C₈ -
Gel konnte bei einem Präparat nach Chromatographie an
DEAE-Cellulose zwar eine weitere 3-fache Anreicherung mit
80%iger Ausbeute erzielt werden; die auffallende Eigenschaft
des Enzyms bis zu einem Gel/Protein-Verhältnis = 1
praktisch nicht adsorbiert zu werden, hängt jedoch offen-
bar stark vom Alterungsgrad der Enzymlösung ab und konnte
nicht reproduziert werden.

In einem großen Ansatz wurde das Verfahren mit 1,4 kg
Bakterien nachgearbeitet. Das Ergebnis waren 212 mg Protein
der spez. Akt. 700 bei einer Ausbeute von 18%. (Vergl. Abb. 12)

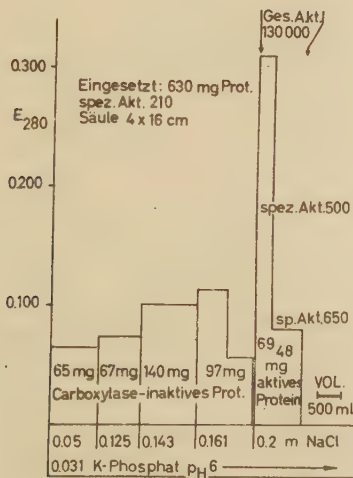


Abb. 12

Chromatographie an DEAE-Cellulose

6. Einige Eigenschaften des reinsten Enzympräparates aus Pseudomonas

Bevor wir weiteren Reinigungsmöglichkeiten nachgingen, prüften wir die Stabilität dieser letzten Enzympräparation gegenüber H^+ -Ionen.

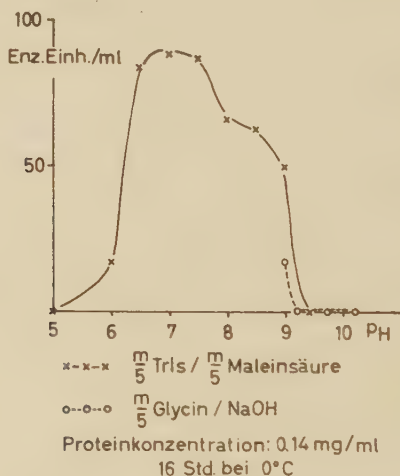


Abb. 13

Das Verhalten des Enzyms in der Ultrazentrifuge zeigte, daß das Präparat noch mit mindestens 4 Komponenten verunreinigt war⁺).

+) Herrn Dr. ZILLIG und Herrn HÖLZL danke ich für die Unterstützung bei der Ausführung dieses Versuches.

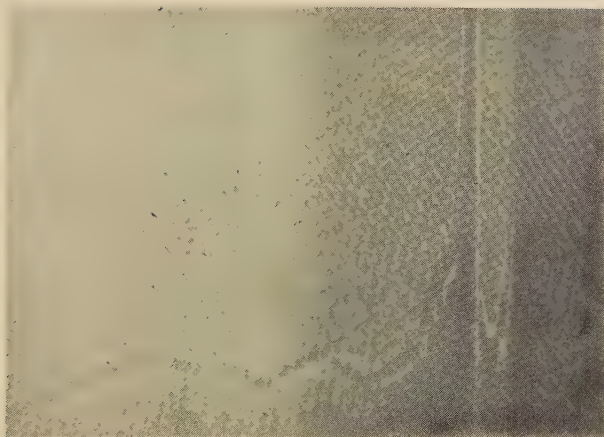


Abb.14

Die Enzymprobe wurde 12 Std. gegen strömenden 0,05 m K-Phosphatpuffer pH 7 dialysiert. Proteingehalt 25 mg/ml. Phywe Ultrazentrifuge: 51 000 U/Min, 72 Min. 190 000 g, +6 °C. Aufnahme nach 72 Minuten.

Die stark ausgeprägte, selbstschärfende Bande entspricht dem am raschesten wandernden Anteil der schon nach 72 Minuten als tiefdunkelbraunes Sediment vom Überstand befreit werden konnte. Darüber lag eine gelbgrüne Schicht. Der farblose Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und getestet. Er enthielt praktisch keine Aktivität. Dagegen konnte in dem mehrmals oberflächlich abgespülten Sediment ein großer Teil der Aktivität nachgewiesen werden. Der Versuch wurde in der präparativen Ultrazentrifuge unter möglichst ähnlichen Bedingungen wiederholt (Spinco-Ultrazentrifuge mit "swing-out"-Rotor). Diesmal wurde farbloser + gelber Überstand abgezogen und die Aktivität mit der des braunen

Sediments verglichen.

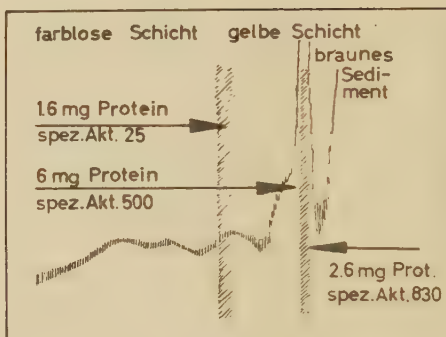


Abb. 15

Damit enthält vorwiegend die tiefbraune Komponente mit der sehr hohen Sedimentationskonstanten das Enzym. Offenbar liegt ein Komplex des Enzymproteins mit einer außerordentlich rasch sedimentierenden Substanz vor. Auf Grund des Verhältnisses $\frac{E_{280}}{E_{260}} = 1,45$ (entsprechend einem Nuclein-

säuregehalt von weniger als 1% ⁵³⁾ kommt wahrscheinlich ein Komplex mit einer hochpolymeren Nucleinsäure hier nicht in Frage. Das Spektrum der braunen Zone weist neben den beiden UV-Banden bei 260 und 280 $m\mu$ eine ausgeprägte Bande bei 405 $m\mu$ auf.

Trotz der offenkundigen Inhomogenität des Proteins war das Präparat praktisch frei von HMG-spaltendem Enzym und Myokinase. ATP-hydrolysierende Enzyme und DPNH-Oxydasen waren nicht in Spuren nachzuweisen. Damit war erreicht, was bei der Reinigung des Enzyms aus *Mycobacterium* spp angestrebt und nur zum Teil erzielt worden war. Das Präparat war vor allem dank der geringen Myokinaseaktivität für noch aus-

stehende Fragen bezüglich des Katalysemechanismus gut geeignet.

Die Hauptmenge des Präparates mußte für diese Messungen zur Verfügung stehen.

7. Elektrophorese im Dichtegradienten

Im Anschluß an die Isolierung des Enzyms aus *Mycobacterium* spp widmeten wir uns einer neuen elektrophoretischen Trennungsmethode. In den letzten Jahren ist durch die Arbeiten von BRAKKE⁵⁴⁾⁻⁵⁶⁾, KOLIN⁵⁷⁾⁻⁵⁹⁾ und SVENSSON¹⁾⁻⁴⁾ ein Verfahren zur präparativen freien Elektrophorese zugänglich geworden. Das Versagen der freien Elektrophorese, wenn die zu untersuchende Substanz in zu geringer Konzentration vorliegt, ist von SVENSSON und VALMET¹⁾ auf die Labilität zu schwacher Konzentrations-Grenzschichten gegenüber thermischer und elektroosmotischer Konvektion zurückgeführt worden. Als notwendige Voraussetzung für eine beständige Substanzzone in einer Flüssigkeitssäule erwies sich ein gewisses Dichteinkrement, das sich über die Zone erstreckt. Diesen Dichtegradient muß jedoch nicht zwangsläufig die zu untersuchende Substanz selbst ausbilden, sondern man kann, wie aus den Experimenten von ERICSON und NIHLÉN⁶⁰⁾ zur Trennung sehr kleiner Mengen von Cobalaminen im elektrischen Feld hervorging, durch Verwendung einer anderen, elektrisch neutralen Substanz künstlich einen Dichtegradienten überlagern. Desselben Prinzips bedienten sich BRAKKE⁶¹⁾, ANDERSON⁶²⁾ und KAHLER⁶³⁾ bei der Stabilisierung von Protein zonen im Schwerfeld der Ultrazentrifuge. Durch geringfügige Modifizierung eines Säulenelektrophoresegerätes der Firma LKB wurden in den schwedischen Laboratorien erstmals erfolgreiche Trennungen niedermolekularer Stoffgemische im Dichtegradienten durchgeführt¹⁾. BRAKKE und SVENSSON berichteten später über Komplikationen, die auftreten, wenn hochmolekulare chemische Individuen getrennt

werden sollen. Hier tritt das von beiden Autoren gleichartig gedeutete Phänomen der Tröpfchenbildung an den Grenzflächen der Startzone auf. Die Erklärung dafür ist die stark verschiedene Diffusionsgeschwindigkeit von Probesubstanz und gradientenbildender Substanz (meist Saccharose). In der Zeiteinheit treten viel mehr Saccharosemoleküle in die Zone als etwa Proteinmoleküle aus der Zone. Mit anderen Worten, die Anfangszone nimmt durch Diffusion mehr gelösten Stoff auf, als sie abgibt. Die Folge ist eine Dichtezunahme, die soweit fortschreiten kann, daß die Dichte der Startzone größer ist, als die der unmittelbar darunterliegenden Lösung. Ist dieser Zustand eingetreten, so beginnt die Zone in Form feiner, mit bloßem Auge sichtbarer Tröpfchen abzusinken. Die Tröpfchen gelangen dabei rasch in ein Medium höherer Dichte, wo sich der Diffusionsvorgang wiederholt. Die Sedimentation schreitet weiter fort und die Tröpfchen können die ganze Säule durchlaufen. Besonders deutlich machte sich diese Erscheinung bemerkbar, wenn man, nach einer früheren Arbeitsweise SVENSSONS, in der Säule durch Entfernung eines Teiles des Gradienten eine Dichtestufe erzeugte²⁾, auf die dann vorsichtig die Probelösung geschichtet wurde. Man dachte schließlich daran, die Diffusionsunterschiede auszugleichen indem man als gradientenerzeugende Substanz Dextran oder dergleichen verwendet. Dadurch sähe man sich aber vor die Aufgabe gestellt, diesen hochmolekularen Stoff nach der Elektrophorese wieder abzutrennen. Eine andere Möglichkeit das Problem anzugehen besteht in der Beimengung von Stoffen wie Kaliumjodid, Glycol, Glycin oder Glycerin, die durch ihre hohe Diffusionsgeschwindigkeit der Diffusion der Saccharose in die Zone entgegenwirken²⁾. SVENSSON löste das Problem später in einfacher Weise durch eine Vorrichtung, bei der hinter die gradientenerzeugende Apparatur eine kleine Mischkammer geschaltet war, die die Probesubstanz enthielt⁴⁾.

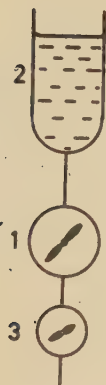


Abb. 16

Diese Anordnung ergibt während der Dichtegradient aufgebaut wird eine kontinuierlich abnehmende Konzentration der zur Elektrophorese eingebrachten Substanz, so daß unter geeigneten Bedingungen eine, auch während des Versuches stabile Zone entsteht.

Wir haben uns lange damit beschäftigt, die Tröpfchenbildung auszuschalten. Nachdem wir die Substanzmengen in 3 - 6 mm starken Startzonen schließlich von 100 - 50 mg auf 30 - 10 mg reduzierten, gelang es, mit einer Einfüllvorrichtung, die im wesentlichen der Anordnung von SVENSSON entspricht, beständige Zonen herzustellen.

An Stelle des Gefäßsystems 1 und 2 verwendeten wir eine Vorrichtung zur Erzeugung eines linearen Gradienten nach BOCK und LING⁶⁴⁾. Das Volumen in Gefäß 3 war je nach Substanzmenge 2 - 4 ml.

BOCK und LING geben die allgemeine Formulierung für eine Gradientenvorrichtung, bestehend aus n Gefäßen gleicher Höhe aber verschiedenen Querschnitten, die mit Lösungen der Konzentrationen C_n gefüllt und über ein gemeinsames Ausflußrohr kommunizierend miteinander verbunden sind. Die einer solchen Anordnung entnommene Flüssigkeit setzt sich aus den relativen Volumina, die jedes Gefäß zum ausfließenden Volumen beisteuert zusammen. Entnimmt man eine gewisse

Menge Flüssigkeit, so daß der Meniskus in der Gefäßanordnung um die Höhendifferenz Δh abnimmt, so ist das Volumen, das jedem Gefäß entnommen wird $A_{n,h} \Delta h$, wobei $A_{n,h}$ die Querschnittsfläche des Gefäßes n in der Höhe h ist.

Die Konzentration als Funktion von v/V (v , entnommenes Volumen, V , Gesamtvolumen der Anordnung) ist gegeben durch

$$C = \frac{\sum_1^n C_n A_{n,h} \Delta h_n}{\sum_1^n A_{n,h} \Delta h_n} \quad (1)$$

Dieselben Autoren beschreiben ein besonders übersichtliches System, in dem die geometrische Form der einzelnen Gefäße die Erzeugung eines gewünschten Gradienten sehr erleichtert.

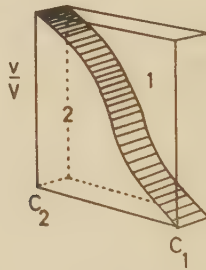


Abb. 17

In einem rechtwinkligen Kasten werden durch eine Trennwand zwei Abteilungen gebildet, die die Gefäße 1 und 2 darstellen und, miteinander kommunizierend verbunden, auslaufen. Der Vorteil eines solchen Kastens mit parallelen Begrenzungsflächen liegt - bei Lösungen gleicher Dichte - in der Konstanz der Oberflächensummen der Flüssigkeiten in jedem Moment des Auslaufens. Damit wird die Konzentrationsfunktion unmittelbar durch die Form der Trennwand wiedergegeben.

Denn, für eine Anordnung mit $n = 2$ und $\Delta h_1 = \Delta h_2$ gilt

$$C = \frac{C_1 A_1 + C_2 A_2}{A_1 + A_2} \quad (2)$$

im rechtwinkligen System ist $A_1 + A_2 = k$; (3)

damit wird

$$C = \frac{1}{k} C_1 A_1 + \frac{1}{k} C_2 A_2 ; \text{ und mit } A_2 = k - A_1 ; \quad (3a)$$

$$C = \frac{1}{k} A_1 (C_1 - C_2) + C_2 ; \text{ oder}$$

$$C = \frac{A_1}{A_1 + A_2} (C_1 - C_2) + C_2 ; \quad (4)$$

Das heißt, solange $A_1 + A_2 = \text{const.}$, ist die Konzentration eine lineare Funktion der Oberfläche A_1 . Für Lösungen verschiedener Dichte ist $\Delta h_1 \neq \Delta h_2$. (In unserem Falle war die Dichte d_2 der Rohrzuckerlösung 2 beträchtlich und zwar bis 1,25 mal höher als die der Lösung 1).

$$\text{Da } \frac{h_2'}{h_1} = \frac{d_1}{d_2}, \quad (5)$$

ist $\Delta h_2' = \frac{d_1}{d_2} \cdot \Delta h_1$; damit wird

$$C = \frac{C_2 A_2' \Delta h_2' + C_1 A_1 \Delta h_1}{A_2' \Delta h_2' + A_1 \Delta h_1}$$

$$C = \frac{C_2 A_2' \cdot \frac{d_1}{d_2} \Delta h_1 + C_1 A_1 \Delta h_1}{A_2' \frac{d_1}{d_2} \Delta h_1 + A_1 \Delta h_1} = \frac{C_2 A_2' \frac{d_1}{d_2} + C_1 A_1}{A_2' \frac{d_1}{d_2} + A_1} \quad (6)$$

$$\text{Setzt man nun } A_2' \frac{d_1}{d_2} = A_2 \quad (7)$$

so geht Gleichung (6) in Gleichung (2) bzw. (4) über.
Um die Bedingung (7) zu erfüllen muß nur, da die Tiefe beider Kammern dieselbe ist, die Meniskushöhe 1

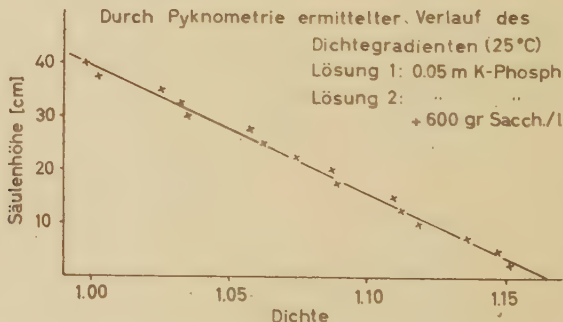
$$l_2' \frac{d_1}{d_2} = l_1 \quad (8)$$

gemacht werden.

Dies geschieht in einfacher Weise durch Einsetzen einer 2. Trennwand, deren Neigung so eingestellt ist, daß in jedem Punkt $\frac{h_2'}{h_1} = \frac{d_1}{d_2}$ ist (5)

Dadurch verringert sich V zwar um das Volumen zwischen beiden Trennwänden. C_1 wird daher innerhalb eines geringeren Volumenintervalls in C_2 überführt. Der Gradient verläuft etwas steiler, bleibt aber linear.

Abb. 18



Eine flexible Apparatur erhielten wir auf folgende Weise. Eine 6 mm starke Plexiglasplatte (20 x 20 cm) wurde auf eine 10 mm starke Sperrholzunterlage gelegt, die als Montagebrett diente. Um einen dichten Flüssigkeitstrog zu bekommen, legten wir an drei Längsseiten der Plexiglasplatte einen in einem Stück geschnittenen Randstreifen aus Weich-PVC, der mit mehreren Schraubzwingen zwischen die erste und eine zweite, ebenso große Plexiglasplatte gepreßt wurde. Eine

diagonal verlaufende Trennwand, ebenfalls aus Weich-PVC, teilte den entstandenen Hohlraum in zwei Kammern, von denen eine die saccharosefreie, die andere die saccharosehaltige Pufferlösung enthielt. Beide Kammern wurden an ihrem tiefsten Punkt durch 3 mm weite Glasrohre, die in einer magnetisch gerührten Mischkammer mit einem Volumen von 5 ml endeten, kommunizierend miteinander verbunden. Ein parallel geschaltetes Manometer gestattete die laufende Druckkontrolle am Boden der Flüssigkeitskammern. Die zweite Trennwand zum Dichteaussgleich zwischen beiden Lösungen faßten wir keilförmig mit der ersten zusammen. Der spitze Winkel des Keiles war der jeweiligen Dichtedifferenz beider Lösungen angepaßt. Die Stärke der Weich-PVC-Einlage gestattet in einfacher Weise eine Angleichung an das Säulenvolumen über das sich der Gradient erstreckt.

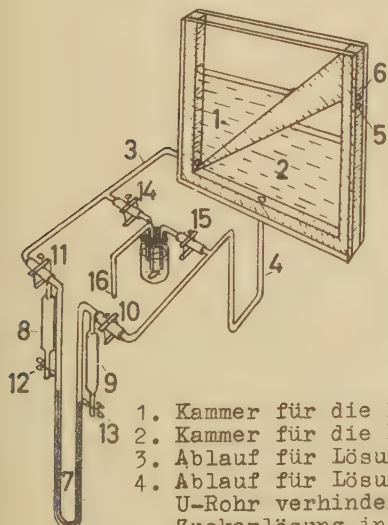


Abb. 19

1. Kammer für die Pufferlösung ohne Rohrzucker.
2. Kammer für die Pufferlösung mit Rohrzucker.
3. Ablauf für Lösung 1 (3 mm lichte Weite)
4. Ablauf für Lösung 2 (3 mm lichte Weite)
U-Rohr verhindert Durchbrechen der dichteren Zuckerlösung in das Mischgefäß bei geringer Strömungsgeschwindigkeit.
5. Bohrung im Weich-PVC-Rahmen für Zufuhr der dichteren Lösung.
6. Luftaustrittsbohrung.
7. Manometer mit Schutzfallen 8 und 9.
- 10, 11, 12, 13 Quetschhähne an den Siliconschlauchverbindungen,
- 14, 15 Quetschhähne an den Siliconschlauchverbindungen zum Mischgefäß I.
16. Auslauf zur Säule.

Von dieser Vorrichtung, die ca. 1,5 m über dem oberen Säulenniveau angebracht war, führte ein dünner Polyäthylenschlauch zum Mischgefäß II, das der Mischkammer 3 in Abb.16 entspricht.

Wir verwendeten das Elektrophoresegerät LKB Nr. 3340 (LKB-Produkte, Stockholm 12, Schweden)(Abb.34).

Die Ausführung der Versuche ist im experimentellen Teil beschrieben.

Um das Verfahren zunächst methodisch zu erlernen, suchten wir, indem wir menschliches Serumprotein einsetzten, die Bedingungen denen von SVENSSON möglichst weitgehend anzugleichen²⁾. (Vergl. Abb. 20)

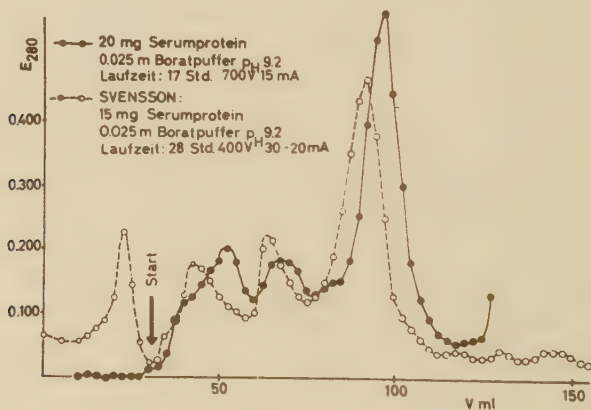


Abb. 20

Wie aus dem Vergleich mit der Kurve von SVENSSON (gestrichelt) hervorgeht, erzielten wir ein vergleichbares Auflösungsvermögen. (Den in Richtung der Kathode wandernden Proteinanteil, dessen Herkunft bisher unbekannt ist, konnten wir nicht beobachten).

Damit ist aber noch nicht die Trennschärfe erreicht wie man sie von der Papierelektrophorese her kennt. Wir versuchten nun, da nicht genügend Erfahrungen aus anderen Laboratorien

vorlagen, durch Variation der Bedingungen mit den Möglichkeiten des Verfahrens vertraut zu werden.

Der Vorschlag von SVENSSON und VALMET¹⁾ zur Überlagerung eines pH-Gradienten erschien erfolgversprechend. Auf Grund der unterschiedlichen Ionenstärke sollte bei Verwendung von Phosphatpuffer der kontinuierlich veränderten H^+ -Ionenaktivität auch eine sich längs der Säule ändernde elektrische Feldstärke resultieren.

Bei der Wahl der Richtung abnehmender H^+ -Ionenkonzentration gingen wir von der Vorstellung aus, daß die raschere Wanderung der höher negativ geladenen Teilchen verstärkt werden muß, wenn sie in Bereiche gelangen, in denen weitere saure Gruppen dissoziieren und durch die entstehenden Anionen einen zusätzlichen Ladungsbeitrag erhalten. Das pH sollte also auf der Anodenseite höher sein als auf der Kathodenseite.

Der Verwendung von Phosphat zur Ausbildung eines pH-Gradienten standen die Puffer-Kapazitätsbereiche zwischen primärem und sekundärem Phosphat einerseits und sekundärem und tertiärem Phosphat andererseits störend im Wege. Außerdem zeigte sich, daß ein pH-Gradient offenbar nicht über längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden kann. Obwohl die Instabilität des pH-Gefälles sicher in erster Linie auf die extrem hohe Beweglichkeit des H^+ und OH^- zurückzuführen sein wird, erprobten wir, um von den hochgeladenen Phosphationen und den Phosphat-Pufferbereichen wegzukommen, Tris-Acetat, dessen Puffergebiete pH 7 - 9 und pH 3,7 - 5,7 an den beiden Enden der Säule liegen sollte. Nach 20stündiger Elektrophorese war das pH am Fuße der Säule 9, am oberen Ende 8,7.

Auf Versuche mit überlagertem pH-Gradienten kamen wir erst später in anderer Form wieder zurück (s.u.).

Ein Versuch mit der freien Base Trishydroxymethylaminomethan zeigte die Möglichkeit der Erzeugung einer hohen elektrischen Feldstärke und einer raschen Wanderung der Proteinmoleküle.

Wegen des hohen pH schienen jedoch die Ladungsunterschiede nicht ausreichend für eine wirksame Trennung. Die besten Ergebnisse wurden mit Tris-Acetat pH 8,3 erhalten. Eine längere Elektrophoresedauer brachte unter denselben Bedingungen keine bessere Auflösung. (Abb. 21)

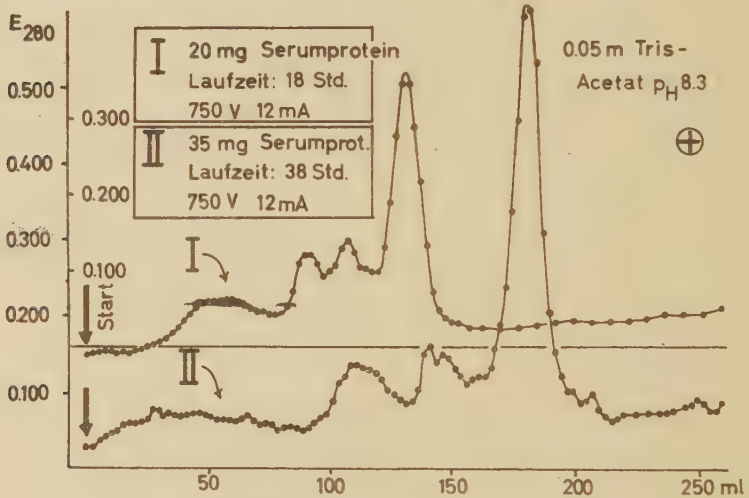


Abb. 21

KOLIN^{57) - 59)} beschreibt eine Versuchstechnik zur Erzeugung "Isoelektrischer Spektren" von Ampholyten. Hier wandern die positiv geladenen Moleküle in einem pH-Gefälle zur Kathode, die negativ geladenen Moleküle derselben Art zur Anode, wobei die Richtung zunehmender H^+ -Ionenkonzentration so gewählt ist, daß die Bewegungsrichtung der Anionen damit übereinstimmt. Dadurch gelangen die negativ geladenen Teilchen in Bereiche, in denen sie zunehmend entladen werden, bis sie am Punkt der Nettoladung 0 mit denselben Molekülspezies, die, positiv geladen, von der Gegenseite kommend, im isoelektrischen Punkt zusammentreffen. Man erhält so eine Auftrennung der Komponenten nach ihrem isoelektrischen Punkt. Die Arbeitsweise von KOLIN ist durch

Anwendung sehr dünner, nur wenige Millimeter starker Schichten gekennzeichnet, an die Lösungen sehr unterschiedlichen pH angrenzen. Durch Diffusion bildet sich ein pH-Gradient längs der Zone aus, der bei einer Elektrophoresedauer von wenigen Minuten beständig genug ist, seine Funktion zu erfüllen. Ein weiterer Kunstgriff zur Stabilisierung des pH-Gefälles besteht darin, daß die Proteinlösung vorher gegen ein Neutralsalz dialysiert wird, so daß die Pufferionen in der Zone weitgehend vom Stromtransport entbunden sind. Von folgenden Überlegungen ausgehend unternahmen wir Versuch 7. Es sollte möglich sein, an den Grenzflächen einer dünnen Startzone, die von sorgfältig gegen NaCl dialysiertem Protein gebildet wird, durch Überlagerung mit alkalischem Puffer und Unterschichtung einer kurzen sauren Schicht, einen starken pH-Gradienten zu erzeugen, der in der ersten Zeit der Elektrophorese zur Ausbildung eines solchen isoelektrischen Spektrums führt. Proteine mit niederem isoelektrischen Punkt müssen dabei näher der sauren Grenzschicht zu liegen kommen. Dieselben Moleküle weisen aber den höchsten negativen Ladungszustand auf und wandern, wenn das pH-Gefälle zusammengebrochen ist und sich über die ganze Säule ein einheitlich hohes pH ausgebildet hat, auch am schnellsten zur Anode weiter. (Vergl. Abb. 22)

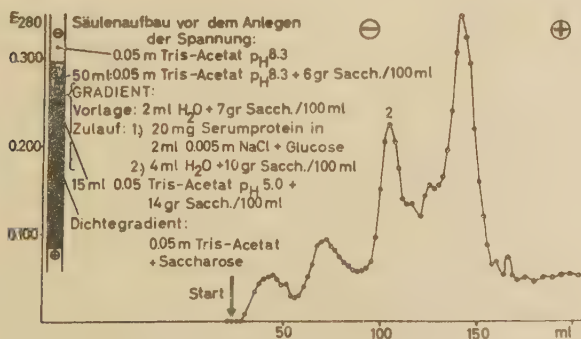


Abb. 22

Die einzelnen Banden sind etwas schärfer gegeneinander abgesetzt und erscheinen in mehr gedrängter Form. Auffallend ist weiterhin der stark ausgeprägte höhere Gipfel 2, der vermutlich die α_2 -Globulinfraktion darstellt.

In Versuch 8 wurde Protein aus *Mycobacterium* spp, das mit Ammonsulfat aus dem Überstand der 2. Ammonsulfatfraktionierung im Zuge der Aufarbeitung des 2. Bakterienansatzes zwischen 0,5 und 1,0 Sättigung ausgesalzen wurde, verwendet.

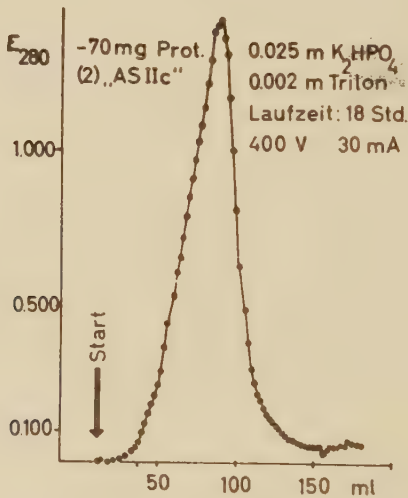


Abb. 23 Versuch 8

Nach den Erfahrungen mit Tris-Acetat-Puffer setzten wir in Versuch 9 3 760 Enzym-Einheiten einer beim 2. Ansatz erhaltenen Carboxylasefraktion nach der Reinigung mit Hydroxylapatit dem elektrischen Feld aus. Die spez. Aktivität des Proteins betrug 275. (Abb. 24).

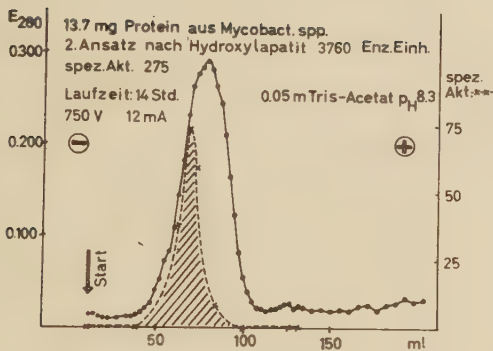


Abb. 24

Die spez. Aktivität der Spitzenfraktion war 72,5 während etwa 20% der eingesetzten Enzymeinheiten wiedergewonnen wurden. Bei einem starken Aktivitätsverlust erfolgte nur eine geringfügige Verschiebung von Aktivität gegen Protein. Stabiles Enzym vorausgesetzt, könnte im Höchstfall mit einem Anreicherungsfaktor von 2 gerechnet werden.

8. Einige Versuche mit anderen Cellulosederivaten

a) Ecteola-Cellulose

Obwohl der durch Umsetzung von Triäthanolamin, Epichlorhydrin und Cellulose erhaltene Austauschere nach den Angaben von SOBER und PETERSON vor allem zur Trennung von Nucleinsäuren geeignet sein soll¹³⁾, befaßten wir uns zu Anfang unserer Reinigungsversuche mit dem Gedanken einer Chromatographie von Nucleoproteiden an diesem basischen Celluloseaustauscher. Das Ergebnis mehrerer Versuche mit

Protein der ersten Ammonsulfatfällung war sehr ähnlich wie bei Verwendung von DEAE-Cellulose.

In Abb.25 ist ein Versuch wiedergegeben, bei dem 8 ml Austauscher mit 8 mg Protein der spez.Akt. 26,5 beladen wurde.

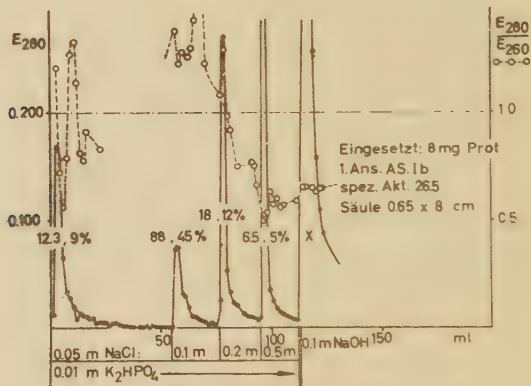


Abb. 25

Die Elution erfolgte durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration in 0,01 m K_2HPO_4 . Über den einzelnen Gipfeln ist jeweils die spez.Aktivität angegeben und die prozentuale Ausbeute bezogen auf die eingesetzten Enzymeinheiten.

Aufschlußreich ist auch folgender Versuch, bei dem Protein aus Bierhefe (Ammonsulfatfällung 0-0,5 eines Hefeextraktes, der durch Zerschlagen der Zellen im SCHLOSSMANN-Zellhomogenisator erhalten worden war) unter gleichen Bedingungen an DEAE-Cellulose und Ecteola-Cellulose chromatographiert wurde. (Abb. 2

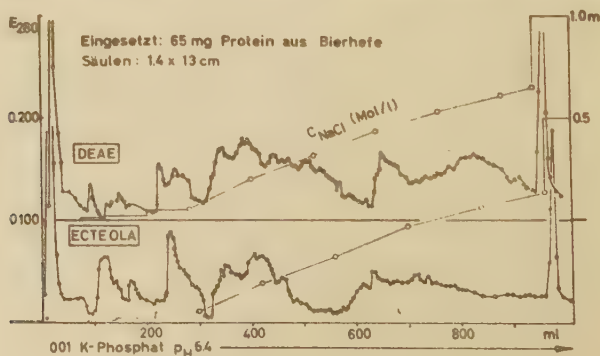


Abb. 26

b) Carboxy-Methyl-Cellulose¹²⁾⁶⁵⁾⁶⁶⁾

Um nach dem Anionenaustauscher DEAE die basischen Eigenschaften des Enzymproteins anzusprechen, untersuchten wir Carboxymethylcellulose¹²⁾ als Kationenaustauscher heranzuziehen. Die Vorbehandlung der CM-Cellulose (S. u. S.) erfolgte nach den Angaben von LIS⁴⁷⁾ mit verdünntem Na- bzw. NH_4 -Acetat pH 4,8 - 5,5. Oberhalb pH 5 wurde nur sehr wenig Protein unspezifisch zurückgehalten, unterhalb pH 5 aber nahm die Aktivität zu rasch ab.

c) Triäthylaminäthyl-Cellulose⁶⁷⁾

Die stark basische Funktion dieses Triäthylaminäthyl-Cellulosederivates, die durch die quarternären Ammoniumgruppen gegeben ist, legte seine Verwendung zur Abtrennung von Nucleinsäuren aus rohen Proteinlösungen nahe. Es gelang auch tatsächlich, dieses Ziel im Experiment an der Säule zu verwirklichen. Die Chloridform des Austauschers wurde mit 0,01 m Tris/HCl pH 7,4 äquilibriert und mit Protein der 1. Ammonsulfatfraktionierung des 3. Mycobakterien-Ansatzes beschickt. (Abb. 27)

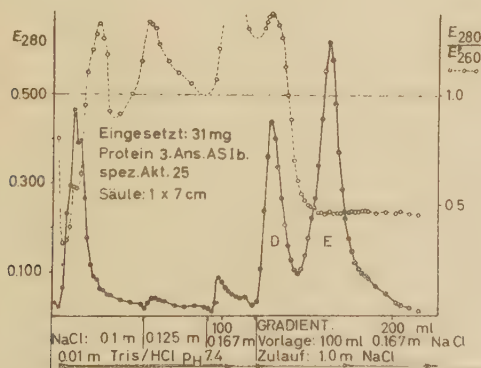


Abb. 27

Es erschienen etwa 50% des aufgegebenen Proteins und 47% der Aktivität in Gipfel D. Der Nucleinsäuregehalt war von 17,5% auf 1,5% gesunken. Gipfel E enthält praktisch ausschließlich Nucleinsäuren, wie man am Verlauf der gestrichelten Kurve, die $\beta = E_{280}/E_{260}$ wiedergibt, erkennen kann. Die spezifische Aktivität war mit 25 gegenüber 26,5 vor dem Versuch nahezu gleich geblieben. Bei Umgehung der Säule und Ausführung des Experimentes im Becherglas, wobei die DEAE-Cellulose in die Proteinlösung eingerührt wurde, gelang dieser Trenneffekt nicht.

II. Biotingehalt der β -MC-Carboxylase und die biochemische Funktion des Biotins bei der Katalyse der CO_2 -Fixierung durch β -MC-CoA

Die eingangs erwähnten Beobachtungen über die herabgesetzte Fähigkeit von Organpräparaten biotinfrei ernährter Tiere Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen auszuführen, legten nahe, nach einer Beteiligung des Vitamins bei der vorliegenden Carboxylierung von β -Methyl-Crotonyl-Coenzym A zu suchen.

Erfahrungsgemäß ist Biotin fest an das Eiweiß gebunden und erst nach 1-stündiger Hydrolyse mit 3,6 n H_2SO_4 im Autoklaven bei 120°C kann Biotin aus dem Eiweißverband gelöst werden. Wir unterwarfen Proben der Enzympräparate dieser Behandlung und nach den von Frl. E. RINGELMANN mit Hilfe des Hefewachstumstestes⁵²⁾ ausgeführten Biotinbestimmungen enthielten alle Präparate Biotin.

Einen ersten Anhaltspunkt dafür, daß Biotin speziell bei der hier untersuchten Reaktion eine wichtige Funktion übernehmen muß, erhielten wir aus der Tatsache der gleichartigen Zunahme von Biotingehalt und Carboxylaseaktivität

bei Präparaten verschiedenen Reinheitsgrades (Abb.28).

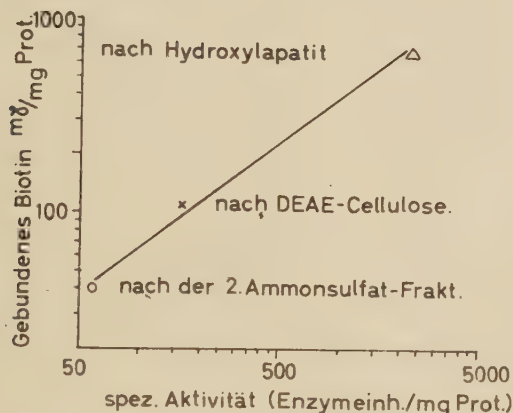
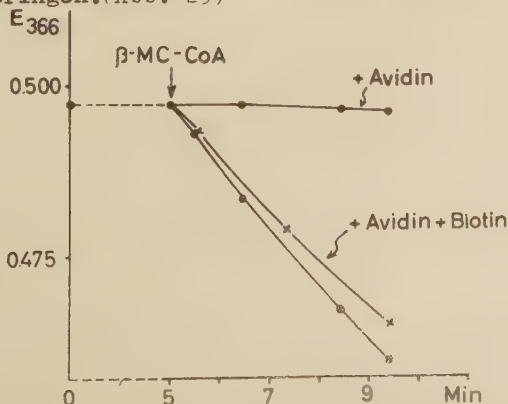


Abb. 28

(In den reinsten Präparaten trifft 1 Mol Biotin auf 344 000 gr Protein. Legt man ein Molgewicht der β -MC-Carboxylase in der Größenordnung von 100 000 zugrunde und nimmt man weiter ein Verhältnis Biotin/Protein von 1:1 an, so kann man schließen, daß der Reinheitsgrad unserer besten Enzympräparate bei 30% liegt).

Die Bestätigung der Vermutung, daß dem Biotin die Rolle der Wirkungsgruppe der β -MC-Carboxylase zukommt, konnte KNAPPE durch den Nachweis der spezifischen Enzymhemmung mit Avidin erbringen. (Abb. 29)

Abb. 29



Sättigt man das Avidin durch Zusatz von freiem Biotin ab, so bleibt das Biotin des Enzyms für die Katalyse erhalten und man beobachtet gegenüber einer Probe ohne Avidin praktisch dieselbe Enzymaktivität.

Mit Hilfe des gereinigten Enzyms aus *Mycobacterium* spp gelang es LYNEN, KNAPPE und RINGELMANN⁴⁴⁾ die Reaktionsfolge im Zuge der Aktivierung der Kohlensäure Schritt für Schritt zu beweisen.

Erste Versuche sprachen dafür, daß das Biotin-Enzym schon an der Spaltung des ATP in ADP und Orthophosphat beteiligt sein könnte, da Avidin den ^{32}P -Einbau in ATP unterbindet, den man bei Inkubation von Carboxylaseprotein mit H^{32}PO_4 und ATP beobachtet, die Hemmung aber durch Zusatz von freiem Biotin beseitigt wird.

Diese Vorstellung ist in Gleichung (1) skizziert.



Diese Formulierung entspräche einer seit längerer Zeit gesuchten Übertragung des ADP-Bruchstückes auf den Acceptor - im Gegensatz zur Kinasereaktion, in der Orthophosphat übertragen wird.

Einen Anhaltspunkt für die Folgereaktion (2)



gab die starke Hemmbarkeit der ^{32}P -Inkorporation in ATP (Gleichung(1) von rechts nach links gelesen) durch HCO_3' , das mit P_{ortho} um das $\text{ADP} \sim \text{Biotin-Enzym}$ konkurriert.

Ein weiterer Beweis für die Existenz eines $\text{CO}_2 \sim \text{Biotin-Enzyms}$ wurde durch Gleichung (3) erbracht.



Inkubiert man 1,3,5 ^{14}C -markiertes $\beta\text{-MG-CoA}$, unmarkiertes $\beta\text{-MG-CoA}$ und Carboxylase, so entsteht radioaktives $\beta\text{-MG-CoA}$.

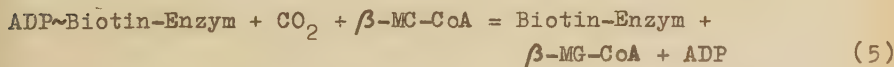
Der Bedarf an Mg^{++} -Ionen schien sich nur auf die ersten beiden Teilreaktionen zu erstrecken.

Die Enzympräparate waren nie völlig frei von ATP-hydrolysierenden Enzymen, unter deren Einwirkung auf ATP es immer zur Bildung von ADP kam. Geringe Mengen von ADP genügten aber, einen Befund zu verschleiern, den erst die ATP-ase-freien Enzymlösungen aus *Pseudomonas* an den Tag brachten: Die ADP-Abhängigkeit des ^{32}P -Austausches. Darnach ist die Voraussetzung für den ^{32}P -Einbau in ATP die Anwesenheit von ADP. Zur Erklärung muß somit auch Gleichung (2) in den Austauschmechanismus mit einbezogen werden.

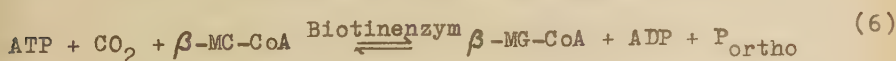


Obwohl der Nachweis für die unter diesen Umständen zu erwartende CO_2 -Abhängigkeit des ^{32}P -Austausches bisher nicht eindeutig geführt werden konnte, nimmt man einen "concerted process" an, der die gleichzeitige Anwesenheit von ADP und CO_2 zur Bildung des $\text{CO}_2\sim\text{Biotin-Enzym}$ erfordert.

Zum Studium der Bilanz der Reaktionen (2) und (3):



wurde früher aus *Mycobacterium* spp gewonnenes Enzym mit $\beta\text{-MG-CoA}$, $\beta\text{-MC-CoA}$, Mg^{++} und $\text{KH}^{14}\text{CO}_3$ inkubiert. Während zur Fixierung von $^{14}\text{CO}_2$ die Gegenwart von ADP notwendig war, blieb ein Zusatz von Orthophosphat ohne Einfluß. Letzterer Befund ließ sich ebenfalls durch Verwendung der neuen ATP-ase-freien Enzympräparate widerlegen. Demnach muß neben ADP auch Orthophosphat anwesend sein, damit Radioaktivität des $^{14}\text{CO}_2$ in $\beta\text{-MC-CoA}$ auftritt. Durch Kombination von (3) und (4) erhält man die Gesamtreaktion (6)



Die ADP-Abhängigkeit des $^{14}\text{CO}_2$ - β -MG-CoA -Austausches (6) wurde seinerzeit erschwert durch Myokinase-Verunreinigungen der Carboxylase aus *Mycobacterium* spp.

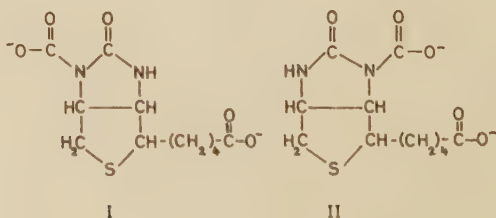
(Nach Gleichung 7:



wird das Gleichgewicht durch Entzug von ADP unter Bildung von ATP ständig auf die Seite des β -MG-CoA verschoben).

Der glückliche Umstand, daß das in Reaktion (4) gebildete CO_2 -Biotin-Enzym das CO_2 statt auf β -MG-CoA auch in sehr spezifischer Weise auf D-Biotin übertragen kann, ermöglichte das Studium der Eigenschaften dieses labilen Körpers. Die hohe Spezifität gegenüber D-Biotin berechnete zu der Annahme, daß man in dem Biotin- CO_2 ein Modell des enzymgebundenen Biotin-Kohlensäurekomplexes vor sich hatte. L-Biotin, Desthiobiotin und die durch Hydrolyse des Harnstoffringes entstehende Diaminocarbonsäure sind völlig unwirksam und nur Biocytin, D-Homobiotin und Norbiotin können in geringem Umfang enzymatisch carboxyliert werden.

Die anfänglich auf Grund der Stabilitätsunterschiede gegenüber Säure und Alkali angenommene allophansäureartige Struktur konnte durch die Charakterisierung des Carboxylierungsproduktes in Form des stabilen Methylesters und durch Synthese und papierchromatographischen Vergleich mit dem enzymatisch gewonnenen Biotin- CO_2 bewiesen werden. Nach diesen Befunden nimmt man für das "Aktive CO_2 " eine von den beiden Strukturen an:



wobei vorläufig noch nicht mit Sicherheit zugunsten von I entschieden werden kann.

Die Reaktivität dieser Verbindung beruht auf einer Polarisierung der C-N-Bindung, die durch die benachbarte Carbonylgruppe begünstigt ist und die den Carboxyl-Kohlenstoff dem nucleophilen Angriff eines Carbeniat-Anions preisgibt.

III. Untersuchungen an der Serinsulphydrase

1. Enzymtest

Die Enzympräparate werden mit den beiden Substraten Serin und Na-Sulfid und dem Coenzym Pyridoxalphosphat in m/10 Tris-HCl pH 8 inkubiert. Nach 2 Stunden wird die Enzymeinwirkung mit m-Phosphorsäure abgestoppt und das ausgefallene Protein abzentrifugiert. Überschüssigen Schwefelwasserstoff treibt man im CO₂-Strom aus und bestimmt photometrisch die Intensität des aus Cystein-SH und Nitroprussid-Natrium entstehenden roten Farbkomplexes bei 546 mμ nach GRUNERT und PHILIPS⁶⁸⁾.

Die Enzymeinheit definiert SCHLOSSMANN¹⁷⁾ in

$$\frac{\mu\text{Mol gebildetes Cystein} \times 100}{120 \text{ Minuten}}$$

Die spezifische Aktivität wird in Enzymeinheiten / mg Protein angegeben.

2. Reinigungsverfahren für Serinsulphydrase aus Bierhefe¹⁸⁾

Die früher ausgearbeiteten Reinigungsschritte sind in Tabelle 8 (siehe nächste Seite) zusammengefaßt.

Tabelle 8

Ausgangsmaterial: 2 kg Bierhefe

	Gesamtprotein (mg)	A k t i v i t ä t		Ausbeute %
		spez.	Enz.Einh.	
Rohextrakt	39 000	(6)	(234 000)	-
1. (NH ₄) ₂ SO ₄ - Frakt. (0,3-0,6)	11 100	(61)	(680 000)	-
Säurefällung	9 400	74	696 000	100
Adsorption an Ca-Phosphat	1 310	260	340 000	49
2. (NH ₄) ₂ SO ₄ - Frakt. (0,4-0,65)	870	370	322 000	46
Chromatographie an DEAE-Cellul.	117	2 200	257 000	37
Zink-Acetat- Fällung	70	3 200	220 000	31

Nach den Erfahrungen mit der Kombination DEAE-Cellulose-Hydroxyapatit bei der Reinigung der β -MC-Carboxylase konnte man vielleicht auch hier nach dem DEAE-Schritt durch Chromatographie an Hydroxyapatit mit einem aktiveren Enzympräparat rechnen.

3. Die weitere Anreicherung

Die bei -15°C aufbewahrte Lösung der 1. Ammonsulfatfraktionierung aus 20 kg Bierhefe wies nach einem Jahr noch 63% der ursprünglichen Aktivität auf. Von hier aus erfolgte die weitere Reinigung, die in 2 Punkten von der alten Vorschrift abweicht: Ca-Phosphat-Gel wurde zur fraktionierten

Adsorption verwendet und die Chromatographie an DEAE-Cellulose wurde unter stufenweiser, nicht kontinuierlicher Erhöhung der Salzkonzentration ausgeführt.

Zur besseren Übersicht sind auch die ersten beiden Reinigungsschritte im experimentellen Teil wiedergegeben.

Die Chromatographie an Hydroxylapatit nach DEAE-Cellulose führte schließlich zu Präparaten, deren Aktivität 1000mal höher war als die des rohen Zellextraktes. (Abb. 31)

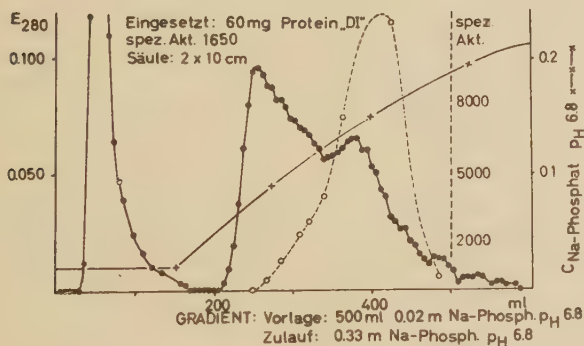


Abb. 31

Die spezifische Aktivität der Gipfelfraktion beträgt 11 500 und ist somit rund 2000mal höher als die des Toluolextraktes. Eine Überschlagsrechnung der Wechselzahl des Enzyms bei Zugrundelegung nur eines aktiven Zentrums und eines Molekulargewichtes von 100 000 ergibt einen Wert von etwa 100. Denn, da 1 mg Protein in 120 Min. die Umsetzung von 115 mMol Serin bewirkt, 1 Mol Protein also in 120 Min. 11 500 Mol umsetzt, beträgt die Wechselzahl für 1 Mol Protein in 1 Min. 96.

Die Wechselzahlen der bekannten Enzyme liegen zwischen 100 und etwa 1 500 000 ⁶⁹⁾. Man muß daher annehmen, daß auch diese Gipfelfraktion noch immer keine reine Serinsulphydrase darstellt.

Mit Präparaten der spezifischen Aktivität 4000 - 6000 wurde das Problem der Gleichgewichtslage



in Angriff genommen.

4. Quantitative Bestimmungsmethoden

- a) Die Bestimmung des gebildeten Schwefelwasserstoffes nach BUDD und BEWICK ⁷⁰⁾

Gemessen wird die Farbintensität von Methylenblau bei 670 mp, das sich aus p-Aminodimethylanilin und H₂S in Gegenwart von Fe⁺⁺⁺ bildet.

- b) Die Bestimmung des Serins⁺)

Aus dem, mit HCl angesäuerten Inkubationsansatz wurde das Serin chromatographisch nach GRASSMANN isoliert und die Ninhydrinfarbe kolorimetriert.

- c) Bestimmung der Brenztraubensäure (in Anlehnung an ⁷¹⁾)

Im optischen Test nach WARBURG wurde Pyruvat mit DPNH unter der Einwirkung kristallisierter Milchsäuredehydrogenase zu Lactat reduziert.

Die Bestimmung erfolgte im nicht angesäuerten Inkubationsgemisch.

⁺) Herrn Dr. BRAUNITZER danke ich für die Ausführung der Serinanalysen.

5. Gleichgewichtsmessungen

Es galt hier zunächst zwei Einflüsse auszuschalten, die die Ergebnisse verfälschen können.

1. Die Einwirkung von Sauerstoff, die in alkalischer Lösung zu Bildung von Polysulfiden und anderen Oxydationsprodukten des Sulfids Anlaß geben würde.

Alle Operationen wurden daher unter Stickstoff ausgeführt, der über einen Kupferturm gereinigt wurde. Alle Lösungen wurden kurz vor ihrer Verwendung mehrmals im Vakuum entgast und mit Sauerstoff-freiem Stickstoff gesättigt.

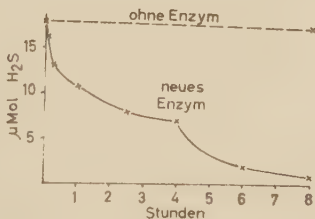
2. Die Verteilung von Schwefelwasserstoff zwischen Gasphase und Lösung würde sehr unübersichtliche Verhältnisse schaffen. Das Gasvolumen über dem Inkubationsgemisch sollte daher klein gehalten werden. Die Versuchsanordnung hierzu ist im experimentellen Teil beschrieben.

a) Versuche zur Erreichung des Gleichgewichtszustandes von der Serinseite.

Abb. 32

Ansatz: 1,2 mmol Tris/HCl pH 8
30 μ l Pyridoxalphosphat
3 μ mol K-Trilonat pH 8
60 μ mol d,l-Serin
Enzym (2500 Enz.Einh.
nach Chrom.an DEAE
spez.Akt. 900

12 ml Startvolumen. Temp. 37°C



Nach der gekennzeichneten Zeit wurde neues Enzym zugegeben. Ein weiterer Versuch, bei dem jede Stunde neues Enzym zugegeben wurde, bestätigte den Befund: Die sehr langsam ab-

laufende Reaktion kann, die Anwesenheit von aktivem Enzym vorausgesetzt, nahezu vollständig auf die Seite des Cysteins gedrängt werden.

b) Versuche zur Ermittlung des Gleichgewichtes von der Cysteinseite

Lag das Gleichgewicht der Reaktion tatsächlich weitgehend auf der Seite des Cysteins, so war die Bildung von Schwefelwasserstoff aus Cystein und deren Beeinflussung durch Serin mit der sehr empfindlichen Methylenblau-Methode exakter zu erfassen, als die Abnahme einer anfänglich sehr hohen H_2S -Konzentration wenn man Serin mit H_2S und Enzym inkubiert.

(Zusammensetzung der Inkubationsansätze siehe experimenteller Teil).

Tabelle 9

μMol l-Cystein	μMol H_2S	nach Std.
10	0	12
10	0	24
30	2,3	12
30	5,6	24
50	10,0	12
50	9,0	24
50 (ohne Enz.)	0	12

In Tabelle 10 ist das Ergebnis einer weiteren Versuchsreihe dargestellt. Hierbei wurden Enzympräparate eingesetzt, die nach Chromatographie an Hydroxylapatit gewonnen worden waren. In Spalte 1 aufgeführte Nummern beziehen sich auf die im experimentellen Teil beschriebenen Versuche. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze und die in Spalte 6 angeführten Bezeichnungen der Enzympräparate sind ebenfalls aus dem experimentellen Teil zu ersehen.

Tabelle 10

Nr.	Eingesetzt:				Gefunden:		
	Inkuba- tionsvol. (ml)	l-Cystein μMol	d,l-Serin μMol l-Serin	Enz.Einh.	Bezeich- nung d. Präp.	H ₂ S μMol	l-Serin μMol
1)	0,8	40	0	1000		2,4	-
2)	0,8	40	6,5	1000		0,9	-
3)	0,8	40	0	0		0,2	-
4)	0,8	40	0	0		0	-
5)	0,8	40	0	250	D1	1,4	-
6)	0,8	40	0	400	D1	1,95	-
7)	0,8	40	0	1200	D1	3,8	-
8)	0,8	40	0	2000	D1	4,8	-
9)	0,8	40	0	2000	D1	5,2	-
10)	0,8	40	0	2000	D1	4,8	-
11)	0,8	0	0	2000	D1	0	-
12)	0,8	0	0	2000	D1	0	-
13)	0,8	40	0	2000	F	3,9	-
14)	0,8	40	0	2000	F	4,1	-
15)	0,8	40	0	2500	D1	4,3	-
16)	0,8	20	0	1320	D1	1,9	-
17)	0,8	20	0	2640	D1	2,4	-
18)	0,8	20	0	3960	D1	3,5	-
19)	0,8	20	0	6600	D1	3,9	-
20)	0,8	20	0	7920	D1	4,3	-
21)	0,8	20	0	7920	D1	3,8	-
22)	0,4	10	0	4000	F	2,65	-
23)	0,4	10	2,6	4000	F	1,8	-
24)	0,4	10	5,2	4000	F	1,15	-
25)	0,4	10	9,1	4000	F	0,04	-
26)	0,4	10	13,0	4000	F	0,04	-
27)	0,4	10	5,2	4000	F	1,10	-
28)	0,4	10	9,1	4000	F	0,04	-
29)	0,4	10	13,0	4000	F	0	-
30)	0,4	5	0 (l-Ser- rin ⁺)	4000	F	1,27	0
31)	0,4	10	0	4000	E	3,2	0
32)	0,4	10	2,6	4000	E	2,0	2,75

Herrn Dr. ZWICK danke ich für die Überlassung des l-Serins.

Die Versuche (1) und (2) sollten den Einfluß von Serin auf das Gleichgewicht zeigen, Versuch (3) und (4) eine möglicherweise spontane H_2S -Abspaltung aus Cystein unter den Bedingungen der Versuche. Aus Versuch (5) bis (10) geht hervor, daß 2000 Enzymeinheiten nicht genügen, damit bei der gewählten Cysteinkonzentration der Gleichgewichtszustand in 3 Stunden erreicht wird.

Versuch (11) und (12) wurde ausgeführt, damit eine H_2S -Abspaltung aus dem Protein ausgeschlossen werden kann.

Versuch (16) - (21) diente der Ermittlung des Gleichgewichts nach 3 Stunden, wobei die Ausgangs-Cysteinmenge gegenüber Versuch (5) - (10) auf die Hälfte reduziert wurde. Mit einer ausreichenden Menge Enzym inkubiert, schien sich aus den Werten der Versuche (22) und (23) beim Studium der Abhängigkeit der Gleichgewichtslage von zugesetztem Serin eine Konstante

$$K = \frac{(\text{Cystein})}{(\text{Serin}) (\text{H}_2\text{S})} \approx 1 \quad \text{zu ergeben.}$$

Die für höhere Serinkonzentrationen zu erwartende H_2S -Bildung in einem Gleichgewichtszustand mit $K = 1$ sind in Abb.33 eingetragen.

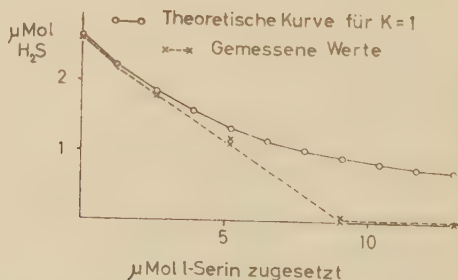


Abb. 33

Die punktierte Linie gibt die gemessenen Werte wieder. (Versuche (22) - (29)). Die starke Abweichung der Meßergebnisse bei hohen Ausgangskonzentrationen an Serin legte die Vermutung nahe, daß bei niederen Serinkonzentrationen eine unbekannte, serinverbrauchende Reaktion stark hervortritt. Um dies zu untersuchen wurden die Versuche (30) - (32) unternommen, wobei gleichzeitig H_2S und Serin bestimmt wurde.

c) Vorläufige experimentelle Befunde und ihre Deutung

1. Bei Inkubation von Cystein mit Serinsulphydrase beobachtet man die Bildung von Schwefelwasserstoff, die abhängig ist von der Cysteinkonzentration und der eingesetzten Enzymmenge. Weder Serin noch Pyruvat (das man nach der bekannten Desulphydrasereaktion⁷²⁾ erwarten könnte) ist nachweisbar.

2. Enzym oder Cystein allein bilden unter den gewählten Bedingungen kein H_2S .

3. Der Zusatz von Serin zum Inkubationsansatz von Cystein und Enzym bewirkt eine Abnahme der H_2S -Bildung, die jedoch in der Massenwirkungsgleichung in der Formulierung

$$\frac{(\text{Cystein})}{(\text{Serin})(H_2S)} = K$$

nicht zu einer Konstanten führt.

Die Ergebnisse der Gleichgewichtsmessungen kann man wie folgt interpretieren:

In Wirklichkeit liegt das Gleichgewicht weit auf der Cysteinseite. Eine höhere Konzentration von Serin unterdrückt die Rückreaktion auf ein sehr geringes Ausmaß. Die H_2S -Bildung, die beobachtet wird, wenn der Serinzusatz unterbleibt, gibt einen Hinweis, daß das Serin weiter verbraucht wird, wobei ein vorläufig unbekanntes Produkt entsteht.

Geringe Mengen Serin haben eine Abnahme der Schwefelwasserstoffbildung zur Folge, weil die stationäre Serinkonzentration durch den Serin-verbrauchenden Vorgang niedrig genug gehalten werden kann, damit aus Cystein meßbare Mengen an H_2S entstehen. Der wahre Gleichgewichtszustand ist dort zu suchen wo die serinverbrauchende Reaktion praktisch nicht mehr ins Gewicht fällt, also bei hohen Gleichgewichtskonzentrationen an Serin. Unter diesen Bedingungen findet man $K \approx 30$.

Die Experimente schließen den gleichzeitigen Ablauf einer Reaktion nicht aus, bei der aus Cystein H_2S nicht unter Bildung von Serin abgespalten wird. Mit Sicherheit wird aber kein Pyruvat gebildet.

C. Experimenteller Teil

=====

I. Das β -MC-CoA-carboxylierende Enzym

1. Substrate und Hilfsenzyme

Die Darstellung der Substrate β -Methyl-Crotonyl-Coenzym A, β -Hydroxy- β -Methyl-Glutaryl-Coenzym A sowie der Hilfsenzyme Arylamin-Transacetylase und HMG-spaltendes Enzym erfolgte nach den Angaben von KNAPPE¹⁹⁾.

(Die Gewinnung des HMG-spaltenden Enzyms aus den Fraktionen, die nach der Chromatographie der 2. Ammonsulfatfällung an DEAE-Cellulose mit 0,5 m NaCl eluiert werden, hätte sich zu zeitraubend gestaltet). HMG-spaltendes Enzym muß im Testansatz meist schon nach dem $MnCl_2$ -Schritt zugesetzt werden. Methylglutaconase wurde nach der Vorschrift von HILZ⁷³⁾ hergestellt und bereits nach der 1. Ammonsulfatfraktionierung dem Test beigegeben.

Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase standen als kristalline Suspensionen zur Verfügung (Boehringer & Söhne, Mannheim).

2. Optische Enzymbestimmungen

Die Ausführung des zusammengesetzten optischen Testes, in dem die Acetylierung von p-Nitroanilin verfolgt wird, ist an anderer Stelle beschrieben.¹⁹⁾

Der ADP-Test.

(Testzusammensetzung. Siehe Legende zu Abb.1).

3. Proteinbestimmung

Schon auf der Stufe der ersten Ammonsulfatfällung ist es möglich, die Biuretmethode nach BÜCHER⁷⁴⁾ durch die KALCKARsche⁷⁵⁾ Methode zu ersetzen. Gerade bei der Anwendung chromatographischer Trennungsvsverfahren bringt diese Art der Eiweißbestimmung erhebliche Vorteile mit sich, da die Messung der Lichtabsorption bei 280 mμ zur Lokalisierung der Proteinbanden, die Absorption bei 260 mμ zur Bestimmung des Nucleinsäuregehaltes in den Eluatfraktionen der Chromatographiesäulen ohnehin erforderlich ist. Aus diesen beiden Werten kann nach der Formel

$$1,45 E_{280} - 0,74 E_{260} = \text{mg/Prot/ml} \quad (\text{für } d = 1 \text{ cm})$$

der Proteingehalt⁷⁵⁾ und durch das Verhältnis

$$\beta = \frac{E_{280}}{E_{260}} \quad 53)$$

der Gehalt an Nucleinsäuren in Erfahrung gebracht werden. Mengen bis 0,1 mg Protein/ml können so noch mit hinreichender Genauigkeit bestimmt werden. In unserem Falle lagen die Proteinwerte nach der KALCKAR-Methode im Vergleich zu den Biuret-Werten etwa 10 - 20% höher. Im Rohextrakt wurden wegen der durch Trübung verursachten Lichtstreuung und der Absorption freier Nucleotide unbrauchbare Ergebnisse erhalten. Die KALCKAR-Methode hat den weiteren Vorteil, daß das Enzymprotein nicht denaturiert wird wie bei der Biuret-Methode.

4. Ausgangsmaterial

a) *Mycobacterium* spp

Zur Erhaltung des auf Isovaleriansäure adaptierten Stammes von *Mycobacterium* spp war von KNAPPE alle 2 - 3 Monate eine Überimpfung auf neue Agar-Nährböden vorgenommen worden. Solche Tochterkulturen wurden als Ausgangsmaterial für die Bakterienzucht übernommen.

Zusammensetzung des elektiven Nährmediums:

5	ml	Isovaleriansäure
0,9	gr	KH_2PO_4
5	gr	NaCl
2	gr	NH_4Cl
0,2	gr	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
0,1	gr	CaCl_2
Spur		FeSO_4
Spur		MnSO_4
0,2	gr	"Bacto-Yeast-Extract, dehydrated" +)
0,2	gr	"Bacto-Peptone" +)
(20	gr	Agar zur Verfestigung)

Auf 1 Liter mit Leitungswasser aufgefüllt. pH wurde mit 4 n KOH auf 7,8 eingestellt.

Mehrere 1-Literkolben mit 500 ml Medium wurden, mit abgeflamten Zellstoff verschlossen, im Dampftopf täglich einmal 40 Minuten erhitzt. Um verbliebenen hitzebeständigen Sporen von Fremdorganismen Gelegenheit zum Auskeimen zu geben, wurde die Sterilisation erst am nächsten und nocheinmal am übernächsten Tage wiederholt. Die Kolben wurden dann mit Hilfe einer ausgeglühten Platinöse mit Bakterienmasse aus den Agarkulturen beimpft und etwa eine Woche bei 31°C unter gelegentlichem Umschütteln bebrütet. Diese Flüssigkeits-

+) Difco Laboratories Inc., Detroit.

kulturen dienten zum Animpfen der großen Ansätze.

Zur Züchtung in Massenkultur wurde eine Stammlösung mit der 10fachen Menge der angegebenen Substanzen ohne Hefeextrakt bereitet, zur Neutralisation der Isovaleriansäure mit 4 n KOH auf pH 7,8 eingestellt und in der Kälte aufbewahrt. Vor Gebrauch wird die Stammlösung auf das 10fache Volumen verdünnt, mit KOH das pH auf 7,8 nachgestellt und jeweils 3 Liter dieser Lösung auf 5-Liter Zuchtfaschen abgefüllt. Nach Zusatz von je 10 ml einer frisch bereiteten Lösung von je 3 gr der beiden "Bacto"-Hefepräparate in 100 ml Wasser erfolgte die Sterilisation der Flaschen mit Belüftungsvorrichtung im Autoklaven 40 Min. bei 134°C.

Zum Zentrifugieren der Bakteriensuspension, die im Verlauf von 16 - 18 Stunden bei 31°C unter kräftiger Durchlüftung entstanden war, verwendeten wir eine Durchlaufzentrifuge mit 40 000 U/Min (Carl Padberg, CEPA-Schnellzentrifuge). Der unmittelbar am Eingang des Rotors sedimentierte weiße Niederschlag schwerlöslicher Salze wurde verworfen, die Bakterienmasse mit wenig Wasser homogen gerührt und schließlich in etwa 30 l Wasser einige Minuten kräftig turbiniert. Nach dem Waschen erhielten wir aus 30 Liter Kulturflüssigkeit durchschnittlich 200 gr Feuchtmasse.

b) *Pseudomonas* aus Rinderpansen

Die Züchtung dieses Organismus erfolgte in einer innen hitzebeständig lackierten Eisentonne von 200 Liter Fassungsvermögen. Ein exzentrisch angebrachter, luftdicht gelagerter Rührer aus V2A-Stahl diente der Durchmischung des Mediums. Die Belüftung erfolgte durch ein 20 mm weites, am Boden der Tonne rechtwinklig gebogenes Stahlrohr, das im unteren waagrechten Teil mit feinen Bohrungen versehen war. Das Einpressen der Luft besorgte ein Kompressor mit einer Leistung von 150 Liter/Minute. Ein Teil des Mediums wurde direkt im Faß sterilisiert, der Rest wegen der leichteren

Handhabung in 20-Liter-Flaschen mit denen der Inhalt der Tonne auf 160 Liter aufgefüllt wurde. Das Inoculum entsprach etwa 80 gr Bakterien-Feuchtmasse / Tonne. Das Wachstum wurde an Hand des pH-Anstiegs (als Folge des Isovaleriansäureverbrauches) und der Trübung verfolgt. Nach 16 - 48 Stunden war je nach Belüftungsintensität optimale Trübung und ein pH von 7,8 - 8,0 erreicht. Die Ausbeute pro Tonne betrug im Durchschnitt 680 gr feuchte Zellmasse/ 160 Liter Medium.

Das elektive Medium für *Pseudomonas* aus Rinderpansen weicht nur geringfügig von dem des *Mycobacterium* spp ab:

5 ml Isovaleriansäure	(nach SCHLEGEL, etwas modifiziert)
1,8 gr KH_2PO_4	
5 gr NaCl	
1 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
0,1 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	
0,05 gr CaCl_2	
0,01 gr $\text{FeSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$	
0,005 gr $\text{MnCl}_2 + 4 \text{H}_2\text{O}$	
0,001 gr $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 + \text{H}_2\text{O}$	
1 γ Biotin	
10 mg Trilon B	

Auf 1 Liter mit dest. Wasser aufgefüllt. pH wurde mit 4 n KOH auf 7,8 eingestellt. (Nach dem Sterilisieren beträgt das pH 7,2).

5. Aufschluß der Bakterienzellen

Die Zerstörung der Zellwand erreichte KNAPPE durch Verreiben mit Aluminiumoxyd. Wir bedienten uns der Methode von SCHLOSSMANN, bei der die Zellen von Mikroorganismen durch hochtouriges Schütteln mit Reflexperlen ("Ballotini beads") zerschlagen werden.

Aufschlußgemisch:

12 gr feuchte Zellmasse

40 gr Glasperlen Nr. 31/12

12 ml 0,03 m Tris-HCl pH 7,3, 0,001 Trilon B

werden in einer 100 ml Durangglasflasche vermengt und 75 Sekunden mit einer Frequenz von 4000 Schwingungen pro Minute im Zellhomogenisator nach SCHLOSSMANN, MERKENSCHLAGER und KURZ⁴⁰⁾ geschüttelt. Die Kühlung mit Kohlensäureschnee muß so eingestellt werden, daß die Temperatur des Flascheninhaltes immer nahe dem Gefrierpunkt bleibt.

Nach dem Aufschluß werden alle Operationen mit dem erhaltenen Bakterienprotein bei 0 - +3°C ausgeführt.

Der schaumige Inhalt der Flasche wird 5 Minuten bei 14000 U/Min zentrifugiert. Zur Extraktion von Zelltrümmern und zum Auswaschen der Glasperlen rührt man 2 x mit je 10 ml 0,03 m Tris/HCl pH 7,3 + 0,001 Trilon B auf und zentrifugiert jeweils 30 Minuten bei 14000 U/Min.

Später entfernten wir die Glasperlen durch Absaugen auf der Glasfritte (G O), eine Arbeitsweise, die besonders bei Reihenaufschlüssen rascher zum Ziel führt. Die Perlen werden mit wenig Puffer ausgewaschen, das Filtrat in 30 Minuten bei 14000 U/Min von den Zellbruchstücken befreit. Aus 100 gr feuchter Zellmasse erhält man etwa 320 ml Extrakt.

6. Reinigung der β -MC-Carboxylase

a) *Mycobacterium* spp als Ausgangsmaterial

1. Ammonsulfatfraktionierung ("AS I")

Der erhaltene gelbbraune, opaleszierende Rohextrakt verliert relativ rasch an Aktivität. Um auf eine Stufe zu kommen, die die Ansammlung einheitlichen Materials gestattet, fällt man mit Ammonsulfat und nimmt das Protein, das zwischen 0,25 und 0,6 Sättigung ausfällt⁷⁾ in wenig 0,03 m Tris-HCl pH 7,3 + 0,001 m Trilon B auf, so daß eine 3-5%ige Proteinlösung resultiert, die sofort eingefroren und bei -15°C aufbewahrt wird.

Ammonsulfatfraktionierung: "AS Ia" 0 - 0,25:

13,8 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (puriss.) zu 100 ml Extrakt.

"AS Ib" 0,25 - 0,6: 21,5 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu 100 ml Überstand von "AS Ia".

Abtrennung der Nucleinsäuren⁴⁵⁾

100 ml der rasch aufgetauten Lösung von "AS Ib" wird 5 Stunden gegen 50 Liter 0,01 m Na_2HPO_4 unter kontinuierlicher Erneuerung der Außenflüssigkeit dialysiert. Nach Verdünnen der dialysierten Lösung mit eiskaltem 0,01 m Na_2HPO_4 auf einen Proteingehalt von 10 mg/ml gibt man tropfenweise unter Rühren 1/20 Volumen frisch bereitete 1 m MnCl_2 -Lösung zu und läßt 30 Minuten im Eisbad stehen. Aus dem Überstand, den man nach 30 Min. Zentrifugieren bei 14000 U/Min erhält, entfernt man überschüssige Mn^{++} -Ionen durch Zugabe von 8,5 ml 2 m KHCO_3 pro 100 ml Lösung.

+) Die Berechnung der Sättigungsgrenzen erfolgte nach⁷⁶⁾

$$X_0 = \frac{51,472 (S_2 - S_1)}{1 - 0,271 S_2}$$

X_0 : gr Ammonsulfat, die zu 100 ml Lösung der Sättigung S_1 bei 0°C gegeben werden müssen, um Sättigung S_2 zu bekommen.

Es bildet sich ein kräftiger, kristalliner Niederschlag von MnCO_3 , den man 45 Minuten später in 10 Minuten bei 14000 U/Min abschleudern kann. Der klare Überstand ist gelbbraun. Der Nucleinsäuregehalt ist von 17% auf 4-6% abgesunken, während 80% der Enzymeinheiten wiedergewonnen werden können.

2. Ammonsulfatfraktionierung ("AS II")

Der Überstand der Bicarbonatfällung wird sofort weiterverarbeitet. Nachdem die Hauptmenge der Nucleinsäuren beseitigt ist, kann die Fraktionierung mit Ammonsulfat in engeren Grenzen ausgeführt werden. Zwischen 0,38 und 0,5 Sättigung fällt Protein ("AS IIb"), das in wenig 0,03 m Tris-HCl pH 7,3 + 0,00 1 m Trilon B gelöst wird, und eine 4-6fache höhere spezifische Aktivität aufweist als der Rohextrakt, während noch etwa 75% der Gesamtaktivität vorliegen.

Ammonsulfatfraktionierung "AS IIa": 0 - 0,38 : 21,7 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pro 100 ml. "AS IIb": 0,38 - 0,5 : 7,15 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pro 100 ml Überstand von AS IIa.

Chromatographie an DEAE-Cellulose

(Vorbehandlung der DEAE-Cellulose und methodische Einzelheiten sind unter 8) beschrieben).

Es erwies sich als günstig, das Austauschermaterial mit 7 mg Protein/ ml feuchte DEAE zu belasten. Für das Protein "AS IIb" aus 100 gr Bakterien sind 90 - 100 ml DEAE erforderlich, deren OH-Form zuerst im Becherglas mit 0,2 m K_2HPO_4 abgesättigt wird, bis das pH nach dem Absitzen im Überstand auf 8,4 gefallen ist. Dann überführt man in eine Säule (ca. 3 x 14 cm) und äquilibriert sorgfältig mit 0,01 m K_2HPO_4 . Nachdem die Proteinlösung "AS IIb" 4 Stunden gegen 25 Liter langsam strömendes 0,01 m K_2HPO_4 dialysiert worden ist, läßt man sie ohne Druck in die DEAE-Cellulose einsickern, wäscht die an der Glaswandung über dem Austauscher haftenden Proteinreste mit wenig 0,01 m K_2HPO_4 nach,

überschichtet die Säule mit einigen ml derselben Lösung und beginnt die Elution. (vgl. Abb.11).

Mit Lösung 1 erscheint zunächst inaktives Protein.

Lösung 1: 0,05 Mol NaCl/l
 0,025 Mol KH_2PO_4 /l
 0,0057 Mol K_2HPO_4 /l

Um bei der Elution ein langsames Ansteigen der Salzkonzentration zu erzielen, legten wir eine Mischkammer⁷⁷⁾ vor, in der sich Lösung 2 befand:

0,1 Mol NaCl/l
0,025 Mol KH_2PO_4 /l
0,0057 Mol K_2HPO_4 /l

Während Lösung 2 magnetisch gerührt wurde, tropfte in dem Maße, wie Puffer vom Mischgefäß auf die Säule abgenommen wurde, Lösung 3 zu Lösung 2.

Lösung 3: 0,152 Mol NaCl/l
 0,025 Mol KH_2PO_4 /l
 0,0057 Mol K_2HPO_4 /l

Bei späteren Versuchen eluierten wir das aktive Protein ohne Gradientenvorrichtung direkt mit 0,118 m NaCl, das in dem angegebenen Phosphatpuffer gelöst war.

Die Fraktionen mit Carboxylaseaktivität werden gesammelt und 3 Stunden gegen strömendes 0,001 m K_2HPO_4 dialysiert. Läßt man dann die Proteinlösung auf einer kleinen DEAE-Säule (ca. 2 x 6 cm), die mit 0,001 m K_2HPO_4 im Ionengleichgewicht steht, auflaufen, so sammelt sich das Protein am Kopf der Säule an und kann durch langsames Eluieren mit 1 m Tris-HCl pH 7,5 in Form einer scharfen Zone verdrängt werden. Die proteinhaltigen Fraktionen werden vereinigt, mit gesättigter Ammonsulfatlösung auf 70% Sättigung gebracht, das ausgefallene Protein zentrifugiert und in wenig Puffer aufgenommen. Die Proteinkonzentration für den nächsten Schritt soll mindestens 10 - 20 mg/ml betragen. Der Anreicherungsfaktor beträgt 3 - 5, die Ausbeute 30-40%.

Chromatographie an Hydroxylapatit⁹⁾⁻¹¹⁾

Die Untersuchungen des Tiselius - Laboratoriums, die sich mit der Verwendung von Ca-Phosphat zur Chromatographie von Eiweißstoffen befassten⁶⁾⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾, führten zur Entwicklung des Hydroxylapatites. Nach den Angaben von TISELIUS⁹⁾ erhält man ein feinkörniges Material, das ohne Druck in Chromatographieröhren gefüllt, eine genügend hohe Tropfengeschwindigkeit ermöglicht. Wir belasteten den Hydroxylapatit - obwohl er nach unseren Erfahrungen eine Kapazität von etwa 10 mg Protein/ ml aufweist - nur mit 2 mg/ml, indem wir, 4 Stunden gegen strömendes 0,001 M Na-Phosphat pH 6,8 dialysierte Proteinlösung vom letzten Schritt auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte Säule aufsetzten. Die Entwicklung des Chromatogramms geschieht durch Erhöhung der Phosphatkonzentration bei gleichbleibendem pH (vgl. Abb.8 und 9). Mit 0,02 M Na-Phosphat pH 6,8 erscheint ein Maximum völlig inaktiven Proteins. Die spezifische Aktivität der mit 0,05 M Na-Phosphat pH 6,8 eluierten Fraktion ist 8 - 10 mal höher als zu Beginn des Versuchs. Die Ausbeute an Gesamtaktivität beträgt 80%.

b) Pseudomonas aus Rinderpansen als Ausgangsmaterial

Im großen und ganzen konnte bei der Isolierung des Enzyms aus Pseudomonas der unter 6 a beschriebene Reinigungsgang beibehalten werden. Einige Änderungen betreffen die Sättigungsgrenzen bei der Fraktionierung mit Ammonsulfat und die Ionenstärke bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose. Durch Chromatographie an Hydroxylapatit war mit Präparaten aus diesem Organismus die Abtrennung weiteren inaktiven Proteins jedoch nicht zu erzielen (Teil B, I, Abschnitt 5).

1. Ammonsulfatfraktionierung (0,38 - 0,62).

Abtrennung der Nucleinsäuren mit $\text{MnCl}_2\text{-KHC}_2\text{O}_4$.

2. Ammonsulfatfraktionierung (0 - 0,48).

Chromatographie an DEAE-Cellulose.

Die Beladung wurde unter denselben Bedingungen wie früher vorgenommen. Die Elution inaktiven Proteins (Abb.13 Lösung 1 - 4) und des aktiven Proteins (Lösung 5) erfolgte mit Phosphatpuffer 0,025 m KH_2PO_4 + 0,0057 m K_2HPO_4 und NaCl, wobei nur die Konzentration des letzteren erhöht wurde.

7. Methodische Einzelheiten beim Arbeiten mit DEAE-Cellulose

Das trockene Pulver wird mehrere Tage in entionisiertem Wasser der Quellung überlassen, wobei man gleichzeitig die feinsten, in etwa 2 Stunden nicht sedimentierten Teilchen absaugt und verwirft. Der Schlämmprozess ist erforderlich, da sonst die Säulen bei der Chromatographie dem Pufferstrom einen zu hohen Widerstand entgegensetzen. Wir behandelten die neue Cellulose mit 1 m NaOH und wuschen mit Wasser alkalifrei. Zweckmäßig überführt man die DEAE-Cellulose anschließend mit 1 m NaCl in die Chloridform, dann mit NaOH wieder in die OH-Form und so fort, bis das Material elfenbeißweiß ist und sich im Auslauf keine Verunreinigung mehr durch Absorption bei 280 und 260 m μ zu erkennen geben. Auch zum Regenerieren gebrauchter DEAE-Cellulose verwendeten wir 1 m NaOH, wobei rasch und in der Kälte gearbeitet wurde. Nach den ursprünglichen Angaben von SOBER und PETERSON¹³⁾ soll kurzfristige Berührung der DEAE-Cellulose mit Lauge dieser Konzentration keinen Einfluß auf ihre Eigenschaften haben. Nach neueren Erfahrungen in den schwedischen Laboratorien⁺)

+) Persönliche Mitteilung von Herrn Dr.HARTMANN.

ist 0,1 m NaOH vorzuziehen, da sonst bei wiederholter Regeneration Verseifungseffekte auftreten. Wir konnten keine wesentliche Veränderung der DEAE-Cellulose bei Behandlung mit 1 m NaOH in ihren Eigenschaften dem Protein gegenüber feststellen.

Die neutralgewaschene OH-Form des Austauschers kann auf verschiedenen Wegen weiterbehandelt werden.

Man kann zuerst mit konzentrierterem Puffer des gewünschten pH absättigen und dann erst auf die erforderliche Ionenstärke äquilibrieren - ein Verfahren, dessen wir uns ausschließlich bedienten - oder man kann sofort mit verdünntem Puffer spülen, bis das pH im Eluat den Wert der zulaufenden Lösung angenommen hat. Die Eigenschaften einer vorher abgesättigten DEAE-Cellulose sind jedoch von denen einer so vorbehandelten eindeutig verschieden.

Vor dem Füllen des Chromatographierohres entfernt man nach dem Vorschlag der schwedischen Forscher (siehe Fußnote Seite 75) die den Cellulosepartikeln anhaftenden Gase durch gründliches Entlüften im Vakuum. Die als dickflüssige Suspension in das Rohr eingetragene DEAE-Cellulose läßt man sedimentieren, während mit etwa 50 cm Wassersäule Überdruck Puffer der gewünschten Ionenstärke durchströmt. Das nach vollständigem Absitzen unter diesen Bedingungen entstehende Austauschervolumen wählten wir als Bezugsgröße für die Belastung mit Protein. Solche Säulen können bei einem Überdruck von höchstens 1,5 m Wassersäule mit ausreichend hoher Tropfgeschwindigkeit betrieben werden. Das Austauschervolumen nimmt dabei noch um etwa $\frac{1}{4}$ ab.

8. Abgeändertes Reinigungsverfahren für β -MC-Carboxylase aus *Macrobacterium* spp beim 2. Ansatz (vergleiche Teil B, I, Abschnitt 3)

1 200 ml, die durch Auflösen der Proteinniederschläge der 1. Ammonsulfatfraktionierung aus insgesamt 4 kg Bakterien erhalten worden waren, enthielten $2,67 \times 10^6$ Enzymeinheiten, die spezifische Aktivität betrug 36,5. Die Behandlung mit $MnCl_2$ und $KHCO_3$ sowie die 2. Ammonsulfatfraktionierung wurde nach einem Vorversuch in 2 Portionen ausgeführt. Das Ergebnis waren 370 ml Enzymlösung mit $2,17 \times 10^6$ Enzymeinheiten bei einer spezifischen Aktivität von 75. Wie erwähnt, war das Präparat jedoch instabil. Nach den Erfahrungen mit konzentrierter Proteinlösung dieses Ansatzes mußte die Dialyse vor der Chromatographie an DEAE-Cellulose umgangen werden. Außerdem sollte die Ansammlung des Proteins in konzentrierter Form am Kopf der Säule und längeres Verweilen bei Kühlraumtemperatur (+3 bis +5°C) vermieden werden. Unter diesen Umständen sahen wir uns gezwungen, das in Abschnitt 6a beschriebene erste Reinigungsverfahren abzuändern, um die Präparation, bei der spezifische und Gesamtaktivität beträchtlich höher lag als beim ersten Ansatz, weiterverarbeiten zu können.

Adsorption an DEAE-Cellulose

Durch die nachfolgend beschriebene Arbeitsweise sollten die Verluste beim Auftauen der Lösung der 2. Ammonsulfatfraktionierung verringert werden. Überdies war es so möglich, die Dialyse zu umgehen und möglicherweise wurde ein Teil des Proteins, das schädigende Wirkung auf die Carboxylase ausübte, rasch abgetrennt. Ein weiterer Vorteil gegenüber dem ersten Verfahren bestand darin, daß die Zeit während der das Protein an DEAE-Cellulose verweilte, sehr viel kürzer war.

Die Enzymlösung wurde in gefrorenem Zustand als Eisblock in einem großen Puffervolumen aufgetaut. Volumen und Salzkonzentration dieses Puffers waren so gewählt, daß Ionenstärke und pH der Lösung entsprachen, die im ersten Reinigungsverfahren zur Elution des ersten inaktiven Proteinanteils verwendet worden war (Abb. 5, 6, 7 und 11). Mit einer Lösung, die 0,025 molar an KH_2PO_4 und 0,0057 molar an K_2HPO_4 war, lagen dieselben pH- und Phosphatkonzentrations-Verhältnisse vor, wie beim ersten Verfahren. Zur Einstellung der Ionenstärke mußte praktisch nur das von der Fraktionierung verbliebene Ammonsulfat berücksichtigt werden. (Die Konzentration an Tris-HCl, das ursprünglich 0,03 molar, beim Auflösen der Proteinniederschläge etwa 2-3fach verdünnt worden war, konnte gegenüber der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration vernachlässigt werden).

Die Konzentration des $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in der Proteinlösung wurde maßanalytisch durch Titration mit BaCl_2 unter Verwendung von Alizarin S als Indikator⁷⁸⁾ zu 0,86 Mol/l bestimmt.

Die Ionenstärke μ von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ beträgt nach

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_0^i C_i z_i^2$$

$C_0, C_1, C_2, \dots, C_i$: Konzentration der einzelnen Ionen in Gramm-Ionen-Gewichten/l,
 $z_0, z_1, z_2, \dots, z_i$: Valenzzahl der einzelnen Ionen.

$$\mu = \frac{1}{2} [2 C_{\text{SO}_4''} + 4 C_{\text{SO}_4''}]$$

$$\mu = 3 C_{\text{SO}_4''}$$

Damit $\mu = 0,05$ wurde, wurde die Konzentration an Ammonsulfat auf $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = \frac{\mu}{3} = \frac{0,05}{3} = 0,0166$ Mol/l eingestellt.

Dies geschah, indem wir je 16 ml der Protein-Lösung (87 mg Protein/ml) mit 0,031 m K-Phosphat pH 6 auf 835 ml verdünnten und durch jeweils 200 ml DEAE laufen ließen, die

mit demselben Phosphatpuffer, der gleichzeitig 0,05 molar an NaCl war, vorher äquilibriert worden war. Dann überführten wir den Säuleninhalt in eine Glasfritte (G 3) und beschleunigten die Elution anhaftender Reste von nichtadsorbiertem Protein durch Auswaschen mit 0,031 m K-Phosphat pH 6, 0,05 m NaCl, bis die Extinktion bei 280 $m\mu$ auf einen konstant niedrigen Wert abgesunken war. Wieder in die Säule überführt, erfolgte die Elution der carboxylaseaktiven Fraktion mit Phosphatpuffer derselben Zusammensetzung, der jedoch 0,118 Mol NaCl/l enthielt. Das Resultat ist in Tabelle 2 angeführt (B, I, 3).

Reinigung an Hydroxylapatit

Ohne die aktive Enzymlösung zu konzentrieren - diese Maßnahme führte wieder zu rascher Aktivitätsabnahme - dialysierten wir gegen 0,02 m Na-Phosphat pH 6,8 und rührten im Becherglas Hydroxylapatit ein, der mit demselben Puffer in der Säule ausgewaschen wurde. (Für 100 ml Lösung, die etwa 3 mg Protein/ml enthielt, wurde 30-40 ml unter Schwerkraft sedimentierter Hydroxylapatit eingesetzt. Schließlich eluierten wir das Enzym mit 0,05 Na-Phosphat pH 6,8 (siehe Tabelle 2).

9. Versuche zur Elektrophorese im Dichtegradienten

Verwendet wurde das Gerät LKB Nr.3340 (LKB-Produkte, Stockholm 12, Schweden).

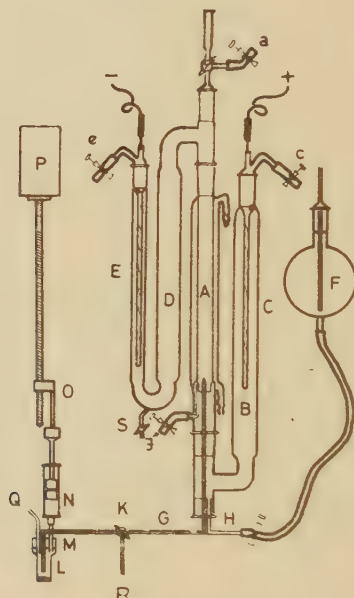


Abb.34

A Elektrophoreserohr (3x40 cm) mit Kühlmantel und Probe-einflüllvorrichtung, Hahn a. (Letztere findet nur bei der Trägerelektrophorese Anwendung). Am Boden der Säule ist eine auswechselbare Siebplatte aus Polyäthylen, die bei der Dichtegradienten-Elektrophorese entfernt wird. B Anodenraum mit Platinelektrode C. Luftaustritt: Quetschhahn c.; D Kathodenraum mit Platinelektrode E. Luftaustritt: Quetschhahn e und Füllstutzen S; F Niveaugefäß; K Kapillarrohr (1 mm lichte Weite); H Füllstutzen; I Rohr zum Entlüften; K 3-Wege-Kapillarahhn; L Mischkammer II, magnetisch gerührt; M Zulaufrohr für Substanzprobe; N Injektionsspritze (2-5 ml) für Substanzprobe; O Vorrichtung mit Elektromotor P für konstante Geschwindigkeit bei der Probenezuführung; Q Zulauf mit Lösung steigender Dichte, die vom Gradientenkasten (Abb.20) kommt; R Zweigleitung zum entleeren der Säule in den Fraktionskollektor.

(a) Beschreibung des Versuchsablaufes

1. Kühlmantel der Säule wurde mit Kühlsole durchströmt ($+2^{\circ}\text{C}$).
2. Bei geöffnetem Hahn c (a, e, I geschlossen) wurde durch Heben des Niveaugefäßes F bei H Pufferlösung 1 in das Anodengefäß B gedrückt, bis dies etwa zu $\frac{2}{3}$ gefüllt war. Dabei wird in den linken Schenkel des U-förmigen Bodenteils Flüssigkeit eindringen bis etwa zum oberen Rand des Verbindungsschliffes. Nun wurde H geschlossen und die, mit der Saccharoselösung 2 gefüllte Niveaubirne bei H angeschlossen. Die Schlauchzuführung muß blasenfrei mit Lösung 2 gefüllt sein.
3. Bei geschlossenem Hahn c wird vorsichtig H geöffnet, wobei sich die dichtere Lösung mit scharfer Grenzfläche unter Lösung 1 schichtet. Behutsames Öffnen von I bewirkt das Ansteigen von Lösung 2 bis an den Boden der Säule, während überstehende Lösung 1 ein Stück in die Säule hineingeschoben wird. Man füllt solange von Lösung 2 nach, bis sie bei I auszutreten beginnt. Dann wird I und H geschlossen, a vorsichtig geöffnet. Im Anodenraum soll die Grenzschicht ca. 5 cm über der unteren Erweiterungsstelle des Elektrodengefäßes erkennbar sein.
4. Die Spitze des Kapillarrohres G ragt etwa 5 mm in das Säulenrohr A. Durch Öffnen des 3-Wege-Hahnes K läßt man die in A eingedrungene Lösung 2 bei R ablaufen. und noch einige ml der überstehenden Lösung 1, von der eine Flüssigkeitssäule von etwa 10-15 cm Höhe im Säulenrohr verbleiben soll. Nun drückt man das Kapillarrohr G vorsichtig nach oben, so daß die Spitze etwa 2 mm aus der Grenzfläche zwischen beiden Lösungen herausragt.

5. Durch Drehen des Hahnes K stellt man die Verbindung mit dem Mischgefäß II her, das 2 - 4 ml der Lösung 1 enthält und vom Gradientenkasten mit laufend dichter werdender Lösung versorgt wird, die durch G langsam in die Säule A strömt. Die Geschwindigkeit des Zulaufes wird durch einen Hahn vor Q so geregelt, daß über der Spitze des Kapillarrohres G immer ein weicher Kegel dichter Lösung liegt, den man deutlich beobachten kann. Der Umschlag von laminarer in turbulente Strömung gibt sich durch einen hohen "Pilz" über der Spitze von G zu erkennen und führt zur Vermischung und damit Zerstörung des Gradienten. Die Zeit für den Aufbau des Dichtegefälles beträgt 5 - 7 Std.

6. Einbringen der Substanzzone

Die zu untersuchende Lösung wird gegen den betreffenden Puffer (Lösung 1) dialysiert. Mit Hilfe eines hydrophoben "Ölgradienten"²⁾ - wir verwendeten Trichloräthylen $\delta_{10^{\circ}} = 1,466$ und Benzol $\delta_{20^{\circ}} = 0,878$ - der in einem Rohr (3x40cm) errichtet wird, kann man nun die Dichte der Proteinlösung mit der Dichte der Saccharoselösung in Mischgefäß II, während der Zuckergradient aufgebaut wird, vergleichen. Hierzu entnimmt man bei M (Injektionsspritze ist noch nicht angeschlossen) einige Tropfen aus der Mischkammer II, bringt sie in den Ölgradienten und beobachtet, wie weit das Flüssigkeitskügelchen nach unten sinkt. Es bleibt an dem Punkt in Schwebelage, an dem seine Dichte der Dichte des umgebenden Mediums entspricht. Damit vergleicht man die Höhe, in der ein Tropfen der Proteinlösung in Schwebelage bleibt. Durch portionsweise Zugabe von Glucose gleicht man nun die Dichte der Proteinlösung auf die Dichte der Lösung in Mischgefäß II ab. (Glucose bewährte sich besser als Saccharose, da dadurch der Proteinzone eine Substanz mit höherer Diffusionsgeschwindigkeit beigegeben wird. Damit

kann man der Tröpfchenbildung besser entgegenwirken). Die Proteinzone setzten wir meist, nachdem etwa 5 - 10cm des Dichtegefälles in A ausgebildet waren.

Dann wurde die Proteinlösung in die Injektionsspritze N aufgesaugt, N mit M verbunden und der Motor P so eingestellt, daß auf 3 - 5 Tropfen der bei Q zulaufenden Lösung 1 Tropfen der Proteinlösung kam.

7. Ist der Gradient vollständig aufgebaut, so sollte die überstehende Pufferlösung 1 in A gerade den Raum zwischen dem oberen Ende des Kühlmantels und der seitlichen Abzweigung des Kathodengefäßes erfüllen. Man schließt nun den 3-Wege-Hahn K, öffnet e während a noch offen ist, verbindet die Niveaubirne bei S mit dem Kathodengefäß und füllt Pufferlösung 1 ein, bis die Flüssigkeitsoberfläche im linken Schenkel des Kathodenraumes einige Zentimeter höher steht als die im Elektrodenraum des Anodengefäßes. Dann wird e geschlossen und weiter aufgefüllt, bis die Lösung bei a gerade austritt, worauf a ebenfalls geschlossen wird.

8. Nun öffnet man e und sorgt durch sehr vorsichtiges Öffnen von c für den Druckausgleich zwischen beiden Elektrodenräumen.

Die Spannung lieferte ein Gleichstromgenerator, den man stufenlos von 0 - 5000 Volt regeln konnte. Ein Ampèremeter ermöglichte die Kontrolle der Stromstärke. Die Kapazität der Elektrodenräume ist nach den Angaben der Hersteller nach dem Durchgang von etwa 3000 Coulomb erschöpft. In unseren Versuchen mußte daher, je nach Stromstärke nach 12 - 18 Stunden mit einem Absinken des pH an dem der Anode zugekehrten Säulende und einem Ansteigen des pH am Kathodenende gerechnet werden. In Fällen besonders langer Elektrophoresedauer ist eine Sicherungsmaßnahme, die Einbringung einer Alkalisperre im U-Teil des Anodenraumes und einer Säuresperre im U-Teil des Kathoden-

gefäßes erforderlich, wodurch die von den Elektroden kommende Säure- bzw. Alkalizone neutralisiert wird (siehe unten, Versuch 3).

9. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Hähne c und e geschlossen, a geöffnet. Der Kapillarhahn K wird nun so gestellt, daß der Inhalt der Säule A durch die Kapillare G über K und R in einen Fraktionskollektor entleert werden kann. Man bedient sich zweckmäßig eines volumen- oder tropfengesteuerten Kollektors, da die rasch abnehmende Viskosität der Lösung ein starkes Ansteigen der Auslaufgeschwindigkeit bedingt.

b) Beschreibung der Versuche

Im nachstehenden werden folgende Abkürzungen gebraucht:

Anod. : Puffer im Anodenraum,
Kath. : Puffer im Kathodenraum,
LL1. : Leichte Lösung 1
SL2. : Schwere Lösung 2
U : Spannung
I : Stromstärke
T : Dauer der Elektrophorese
Sacch. : Saccharose, Merck "puriss."

Versuch 1 (vergl. Abb.20)

Anod. 0,025 m H_3BO_3 , mit NaOH auf pH 9,2 eingestellt
Kath. " " " " " " " "
LL1. " " " " " " " "
SL2. " " " " + 500 gr Sacch./l

Protein: Humanserum, das durch Zentrifugieren von Vollblut bei 0°C gewonnen war. Wurde undialysiert eingesetzt.

U : = 600 - 800 V,
I : = 15 mA,
T : = 17 Stunden

Versuch 2

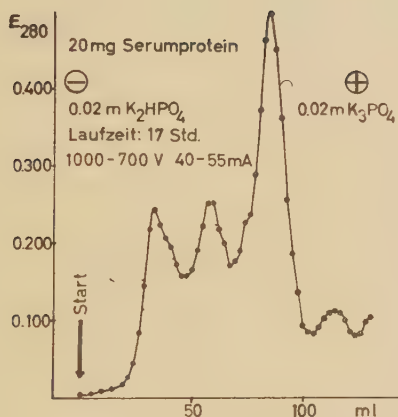


Abb. 35

Anod. 0,02 m K_3PO_4
 Kath. 0,02 m K_2HPO_4
 LL1. 0,02 m K_2HPO_4
 SL2. 0,02 m K_3PO_4 + 800 gr Sacch./l

Protein wie bei Versuch 1.

Das pH bewegte sich im Puffergebiet von $HPO_4^{2-} = PO_4^{3-} + H^+$

Damit ist aber die pH-Änderung längs der Säule nicht groß.

Nach der Elektrophorese: pH am Boden der Säule: 11,

am Kopf der Säule: 10,3.

In einem Vorversuch ermittelten wir den pH-Verlauf, wenn an der Anodenseite tertiäres, auf der Kathodenseite primäres Phosphat eingesetzt wurde. Auch hier verhinderte das Puffergebiet $H_2PO_4^- = HPO_4^{2-} + H^+$ eine signifikante pH-Änderung im Bereich der Protein zonen. Vielmehr stellte sich rasch ein pH von etwa 5 über die ganze Säule ein.

Um den Versuch über einen längeren Zeitraum ausdehnen zu können, füllten wir den U-Teil zwischen Anode und Säule mit einer Sperrschicht aus 20 gew.-%iger KOH, den U-Teil des Kathodengefäßes mit 20 gew.-%iger H_3PO_4 (Instruction manual des LKB-Gerätes 3340).

Versuch 3

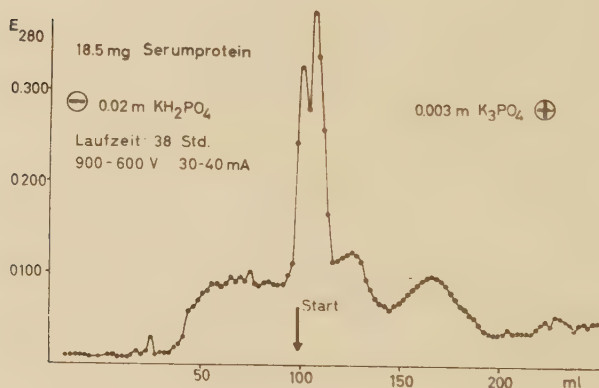


Abb. 36

Anod. 0,02 m KH_2PO_4
 Kath. 0,0033 m K_3PO_4
 LL1. 0,02 m KH_2PO_4
 SL2. 0,0033 m K_3PO_4 + 700 gr Sacch./l

Protein wie bei Versuch 1 und 2. Nicht dialysiert.

In Versuch 4 setzten wir die freie Base Trishydroxymethylaminomethan ein, um durch geringe Ionenstärke eine möglichst hohe Feldstärke zu bekommen.

Versuch 4

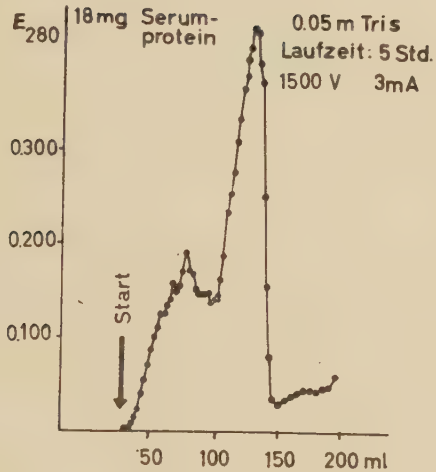


Abb. 37

Anod., Kath. LL1. 0,05 m Tris
SL2. 0,05 m Tris + 800 gr Sacch./l

Protein wie bei Versuch 1,2 und 3.
14 Stunden gegen 0,05 m Tris dialysiert.

Versuch 5

Abb.21, Kurve I

Anod., Kath., LL1. 0,05 m Trisacetat pH 8,3
SL2. 0,05 m Trisacetat pH 8,3 + 600 gr Sacch./l

Protein: Humanserum, durch Zentrifugieren von Vollblut bei
20°C gewonnen.

Versuch 6

Abb.21, Kurve II

Wie Versuch 5, jedoch T = 38 Stunden.

Versuch 7

Abb. 22

Versuchaufbau in Abb. 22 beschrieben.

Versuch 8 (Abb.23)

Anod., Kath., LL1. 0,025 m K_2HPO_4 + 0,002 m K-Trilonat pH 8,2
SL2. " " + " " "
+ 600 gr Sacch./l

Protein: aus Mycobacterium spp 2. Ansatz AS II c (0,5 - 1,0)
Dialyse 4 Stunden gegen 0,025 m K_2HPO_4 +
0,002 m K-Trilonat pH 8,2.

U = 400 V,

I = 30 mA,

T = 18 Std.

Versuch 9

Abb.24

Anod., Kath., LL1. 0,05 m Tris-Acetat pH 8,3
SL2 0,05 m Tris-Acetat pH 8,3 + 600 gr Sacch./l

Protein: aus Mycobacterium spp 2. Ansatz nach Hydroxylapatit
(Tabelle 2), 5 Stunden gegen 0,05 m Tris-Acetat
pH 8,3 dialysiert.

II. Die Serinsulfhydrase

1. Der Enzymtest

Der Enzymtest ist an anderer Stelle ausführlich beschrieben.¹⁷⁾¹⁸⁾

2. Anreicherung

Alkalischer Toluolaufschluß

10 kg frische, abgepresste, untergärige Bierhefe werden fein zerkrümelt in einem 50 l-Emaillegefäß mit soviel 50°C warmem Toluol übergossen, daß die Hefe gerade damit bedeckt ist. Im Wasserbad von 45°C knetet man das Gemisch mit einem Holzlöffel kräftig durch, bis die Hefe nach 20 Minuten flüssige Konsistenz annimmt. Nachdem man das überschüssige Toluol nun rasch abgegossen hat, wartet man unter Umrühren die beginnende Gärung ab. Wenn große Gasblasen an die Oberfläche steigen, nimmt man vom Wasserbad und verteilt unter langsamen Rühren innerhalb 5 Min. 2 n KOH auf die Oberfläche, bis pH 8,6 erreicht ist (kurzzeitige pH-Messung mit Glaselektrode). Man benötigt etwa 1150 ml 2 n KOH. Zu hohe lokale Alkalikonzentration vermeiden.

Nach weiteren 1 3/4 Stunden bei Raumtemperatur (langsam rühren) wird das pH in Abständen von anfangs 10 Minuten kontrolliert und mit 2 n KOH nachgestellt. Dann überführt man die Aufschlußlösung in ein verschließbares 15 l-Glasgefäß, setzt 5 l eiskaltes, entionisiertes Wasser zu, rührt gut durch und läßt 5 Stunden bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei +3°C) verschlossen stehen.

Dann zentrifugiert man in der Kälte bei 3 - 4000 g ab, hebert die hellbraune Mittelschicht zwischen Bodensatz und

obenauf schwimmender Toluol-Stromata-Emulsion ab und filtriert in der Kälte durch mehrere Büchner-Trichter (30 cm Durchmesser) Filter: S.u.S. Nr.595, darauf eine 1 - 2 mm starke Schicht aus Celit (Johns Manville). Der zunächst trübe Saft kann durch wiederholtes Zurückgießen weitgehend klar erhalten werden. Man bekommt etwa 10 l Extrakt (Proteingehalt 15 - 25 mg/ml).

1. Ammonsulfat-Fraktionierung (0,3 - 0,6)

10 l Rohextrakt werden in der Kälte langsam mit 1681 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt. 2 Stunden nach der letzten Zugabe zentrifugiert man bei 20 000 g. Der Niederschlag wird verworfen. Der Überstand (ca. 10,5 l) wird mit 18,45 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/100$ ml auf 0,6 Sättigung gebracht. Die Fällung bleibt über Nacht bei 0°C stehen. Am nächsten Morgen kann man bis zu 2/3 klaren, gelbbraunen Überstandes abziehen. Der Rest wird in der Kälte bei 20 000 g zusammenzentrifugiert und in 0,1 m Tris-HCl pH 8 aufgenommen (Endvol. ca. 600 ml).

Dialyse: 15 Stunden gegen 50 l strömendes entionisiertes Wasser ⁵¹⁾. Die Proteinlösung muß dabei klar werden; sie ist tief dunkelbraun gefärbt (Bez. "AS Ib").

Die Proteinlösung zweier solcher Ansätze wurde dialysiert, eingefroren und ein Jahr später weiterverarbeitet wie folgt:

Ansäuern auf pH 5,3

1680 ml Proteinlösung vom letzten Schritt (4,3 Mill. Aktivitätseinheiten, Spez.Akt. 50) wurden mit 2,5 l eiskaltem entionisiertem Wasser versetzt, so daß eine etwa 2%ige Lösung entstand. Unter Rühren an der Zulaufstelle erfolgte die Einstellung des pH auf 5,3 (dazu wurden rund 310 ml 1 m Essigsäure benötigt, die mit einigen Tropfen 5 n KOH auf pH 4,5 gebracht war).

Adsorption an Ca-Phosphat-Gel

Ohne zu Zentrifugieren wurden nun 840 ml Ca-Phosphat-Gel (Bereitung nach HEPPEL⁷⁹⁾ und KELLIN-HARTREE⁸⁰⁾ +) eingee-
rührt, das nach 20 Minuten abgeschleudert wurde (1500 U/Min.)
"GEL I".

Die Behandlung des Überstandes mit 340 ml Gel lieferte den
Niederschlag "GEL II". Schließlich, nach weiteren 340 ml
"GEL III". Nachdem die einzelnen Gel-Niederschläge je 2 mal
mit 840 ml ("GEL I") bzw. 340 ml ("GEL II" und "GEL III")
entionisierten Wassers gewaschen worden waren, erfolgte die
Elution mit 0,02 m K-Phosphat pH 7,7. Für "GEL I":
2300 ml, für "GEL II" und "GEL III" je 850 ml.

Tabelle 11

Eluat von	Enzymeinheiten	spezifische Akti- vität
"GEL I"	550 000	50
"GEL II"	635 000	167
"GEL III"	1 100 000	345

+) 250 ml 1 m CaCl_2 wurden mit 7 - 10 Liter Wasser vermischt
und unter Rühren langsam mit 334 ml 0,5 m Na_3PO_4 versetzt.
Nach dem Absitzen des Niederschlages wurde mit 2 m Essig-
säure auf pH 7,3 eingestellt⁸⁰⁾. Die pH-Messung erfolgte
jeweils nach kurzem Absitzen des Gel-Niederschlages im
Überstand mit der Glaselektrode. Dann wurde 3 mal mit
Wasser gewaschen, der Niederschlag kurz abzentrifugiert
und noch 2 mal mit Wasser aufgerührt. Schließlich wurde
auf 1 kg mit dest. Wasser aufgefüllt. Das Gel wird bei
+5°C aufbewahrt, soll aber möglichst frisch verwendet
werden (Gehalt an $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: ca. 17 mg/ml.).

2. Ammonsulfat-Fraktionierung (0,4 - 0,65)

Die Eluate der einzelnen Gelfraktionen wurden weiterhin getrennt verarbeitet.

Nach Zugabe von 23 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/100$ ml erhält man Eiweiß, das verworfen werden kann. Der Überstand wird mit 15,6 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/100$ ml auf 0,65 Sättigung gebracht. Hierbei fällt das aktive Protein (Bezeichnung "AS IIb"), das in wenig Tris-HCl pH 8 aufgenommen wird. Die einzelnen Fraktionen wurden getestet.

Tabelle 12

AS II b aus dem Eluat von	Bezeichnung nach AS II b	Enzym-Einheiten	spezifische Aktivität
"GEL I"	A	525 000	100
"GEL II"	B	740 000	335
"GEL III"	C	1 055 000	485

Chromatographie an DEAE-Cellulose

"B": Säule 22 x 4 cm (250 ml) DEAE, die mit 0,2 m K-Phosphat pH 5,1 abgesättigt, mit 0,005 m K-Phosphat pH 5,1 äquilibriert war.
Beladung: 2 220 mg Protein "B",
das 5 Stunden gegen 0,005 m K-Phosphat pH 5,1 dialysiert war.

Elution: 1. 0,005 m K-Phosphat pH 5,1
2. 0,083 m " "
3. 0,1 m " "
4. 0,1 m K_2HPO_4

"A": Säule 25 x 4 cm (315 ml) DEAE, vorbehandelt wie bei "B".

Beladung: 5 200 mg Protein "A", dialysiert wie bei "B".

Elution: 1. 0,1 m K-Phosphat pH 5,1
2. 0,1 m K_2HPO_4

"C": Säule 20 x 4 cm (250 ml) DEAE, vorbehandelt wie bei "A" und "B".

Beladung: 2 130 mg Protein "C", dialysiert wie bei "A" und "B".

Elution: 1. 0,1 m K-Phosphat pH 5,1
2. 0,1 m K_2HPO_4

In Abb.38 ist das Ergebnis der Chromatographie an DEAE-Cellulose der 3 Präparate A, B und C schematisch dargestellt. Die Höhe der einzelnen Säulen ist ein Maß für die spezifische Aktivität, die Fläche ein Maß für die Gesamtaktivität, da die Breite der Säule die Menge des gewonnenen Proteins darstellt.

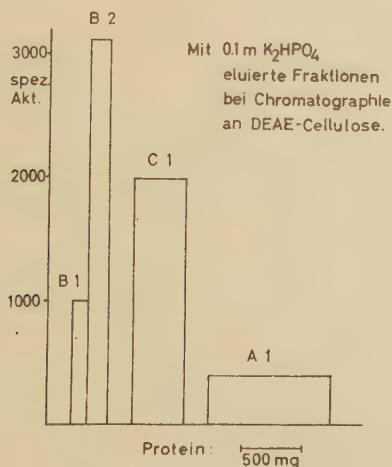


Abb. 38

Die Konzentrierung der aktiven Fraktionen erfolgte nach 3-stündiger Dialyse gegen entionisiertes Wasser durch erneute Adsorption an DEAE und Elution mit 1 m Tris-HCl pH 8 (vergl. Teil B, I, Abschn.4).

Vereinigt wurde Fraktion "B 2" mit "C 1"
und "A 1" mit "B 1"

Tabelle 13

Bezeichnung	nach Konzentrierung			Ausbeute % bezogen auf "AS I"
	spez.Akt.	mg Protein	Enz.Einh.	
B 2 "D 1" C 1	1650	455	750 000	17,4
A 1 "D 2" B 1	370	620	230 000	5,4
			980 000	22,8

Vorversuch zur Chromatographie an Hydroxylapatit

Auf einer Säule 1 x 10 cm (8 ml) von Hydroxylapatit, die mit 0,005 m Na-Phosphat pH 6,8 äquilibriert war, wurden 20 mg Protein "B 1" (17 600 Enz.Einh., spez.Akt. 880 gegeben).

Elution: Na-Phosphat pH 6,8 steigender Konzentration.

(Vergl. Abb. 39, nächste Seite)

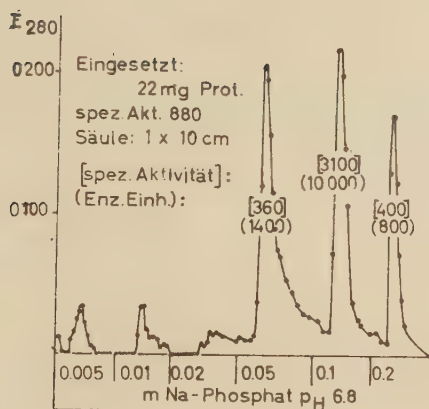


Abb. 39

Der Hauptteil der Aktivität erschien mit 0,1 m Na-Phosphat.
Die Ausbeute betrug in diesem Gipfel 57%.

Versuch zur schärferen Trennung

Eine Säule 2 x 10 cm (31 ml) Hydroxylapatit, die wie
im letzten Versuch vorbehandelt war, wurde mit 60 mg Protein
"D 1" beschickt (99 000 Enz-Ein., spez.Akt. 1650)

Elution: 1. 0,02 m Na-Phosphat pH 6,8

2. Gradient:

Vorlage: 500 ml 0,02 m Na-Phosphat pH 6,8

Zulauf: 0,33 m Na-Phosphat pH 6,8

vergl. Abb.31.

Gesammelt wurde Fraktion 18 - 36

Bez. "D1A1"

und 37 - 55

Bez. "D1A2"

Tabelle 14

Bezeichnung	nach Konzentrierung			Ausbeute % bez.a. "D 1"
	spez.Akt.	Protein (mg)	Enz.Einh.	
D1A1	1450	17,0	24 700	25
D1A2	4500	7,8	36 000	36
			60 700	61

Aufarbeitung der verbliebenen Enzympräparate nach Chromatographie an DEAE-Cellulose durch Chromatographie an Hydroxylapatit

1. Säule 2 x 10 ml (31 ml)

Protein 92 mg D 1 (152 000 Enz.Einh.)

Elution	Bez.	spez.Akt.	Enz.Einh.	Ausbeute %
0,07 m	-	0	0	-
0,135 m	D1B1	4750	73 000	48
0,18 m	-	-	-	-

2. Säule 2 x 10 cm (31 ml)

Protein 92 mg D 1 (152 000 Enz.Einh.)

0,07 m	-	0	0	-
0,1 m	D1C1	6400	57 600	38
0,135 m	D1C2	4900	28 000	18,4

3. Säule 3 x 14 cm (100 ml)

Protein 180 mg D 1 (297 000 Enz.Einh.)

Elution: 1. 0,02 m Na-Phosphat pH 6,8

2. Gradient:

Vorlage: 1000 ml 0,02 m Na-Phosphat pH 6,8

Zulauf: 0,33 m Na-Phosphat pH 6,8

Die gesammelten aktiven Fraktionen wiesen eine spezifische Aktivität von 4000 auf. Bezeichnung: "D1D2".

Tabelle 16

Vereinigt wurden:		nach Konzentrierung	
Fraktion	Bezeichnung	spez. Akt.	Enz. Einh.
D1C1 } D1C2 } D1D2 }	zu "E"	3 750	347 000
D1A2 } D1B1 }	zu "F"	6 600	109 000
			456 000 d.s. rund 10% der Enz.Einh.von "AS I b"

3. Untersuchung der Gleichgewichtslage der Reaktion



a) Quantitative Bestimmung von Schwefelwasserstoff nach
BUDD und BEWICK⁷⁰⁾

Lösungen:

α) Zink-Acetat-Vorratslösung.

200 gr Zinkacetat x 2 H₂O in Wasser lösen, auf 1 Liter auffüllen.

β) Verdünntes Zinkacetat.

100 ml Vorratslösung (α) unter Zufügen von 1 ml
2 n Essigsäure mit H₂O auf 1 Liter auffüllen.

γ) Amin-Vorratslösung.

24,3 gr p-Amino-Dimethylanilin x 2 HCl x H₂O werden
in kalter, mit Wasser 1:1 verdünnter 96%iger H₂SO₄
gelöst, mit 1:1 H₂SO₄ auf 100 ml aufgefüllt
(einige Monate haltbar).

δ) Verdünnte Amin-Lösung

25 ml Vorratslösung (γ) auf 1 Liter mit 1:1 H_2SO_4 auffüllen. (Etwa 1 Monat haltbar).

ε) Fe^{+++} - Lösung

100 gr $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ in 100 ml Wasser lösen.

Eichkurve:

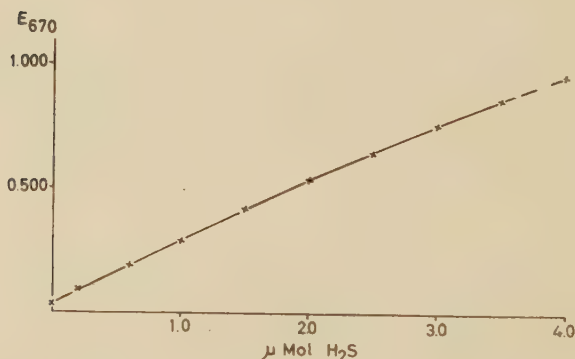


Abb. 40

Sulfidstandard:

Ein Kristall von etwa 1,2 gr $Na_2S \cdot 9 H_2O$ wurde in 1 Liter dest. Wasser gelöst. Der S"-Gehalt wurde maßanal. zu 0,54 mmol/100 ml bestimmt. 92,6 ml dieser Lösung wurden auf 500 ml aufgefüllt, so daß 1 $\mu Mol S$ /ml vorlag. Je 100 ml verd. Zinkacetat (β) wurden nun mit Sulfidstandard versetzt, das Volumen mit dest. H_2O auf 140 ml ergänzt, mit je 8 ml Aminlösung (δ) versetzt, rasch verschlossen und umgeschüttelt. Nach 10 Min. wurden 2 ml $FeCl_3$ -Lösung (ε) einpipettiert, schnell wieder verschlossen und kräftig geschüttelt. Nach Farbentwicklung (15 - 30 Minuten) wurde die

Extinktion bei 670 m μ gegen Luft gemessen ($d = 1$ cm). Geringere H₂S-Konzentrationen können durch entsprechende Verkleinerung von Absorptionsvolumen und Reagensvolumen bestimmt werden. Größere Mengen H₂S bestimmt man besser in einem aliquoten Teil. Die Verdünnung nach Farbentwicklung führt zu Fehlern bis 5%.

(b) Ausführung der Gleichgewichtsmessungen

In einer ersten Versuchsanordnung wurden Zentrifugengläschen mit einem Volumen von 12 ml möglichst hoch aufgefüllt. Die dadurch verursachte Verdünnung wirkte sich naturgemäß auf die Reaktionsgeschwindigkeit aus. Außerdem verlor das Enzym in der geringen Konzentration rascher an Aktivität (vergl. Abb.32).

Später konnte das Inkubationsvolumen auf 0,8 ml und weniger reduziert werden durch Verwendung kleiner Injektionsspritzen als Inkubationsgefäß. (Tuberculin-Spritzen mit Glaskolben.) Die Spritzen wurden bei entferntem Kolben mit der Pipette gefüllt. Nach dem Einsetzen des mit Siliconfett leicht fetteten Kolbens wurde die Spitze nach oben gerichtet, geöffnet und durch Nachschieben des Kolbens die Luft aus der Spritze verdrängt. Die mit einer Gummikappe verschlossene Injektionsspritze blieb dann bei konstanter Temperatur im Wasserbad bei 37°C.

Zum Abstoppen der Reaktion und zum Freisetzen des Schwefelwasserstoffes wurde mit Perchlorsäure angesäuert.

In der ersten Versuchsanordnung geschah dies durch Einspritzen der Säure an einer dafür vorgesehenen Bohrung im Verschlußstopfen, die während der Inkubation mit einem Glasstäbchen verschlossen war.

Im zweiten Fall wurde die Spitze der Tuberculinspritze geöffnet und bei A mit einem kurzen Siliconschlauchstück mit dem schwenkbaren Gefäß (Abb.41 siehe nächste Seite) verbunden, das vorher mit sauerstoff-freiem Stickstoff gründlich durchspült worden war. Nun wurde der Inhalt der Spritze

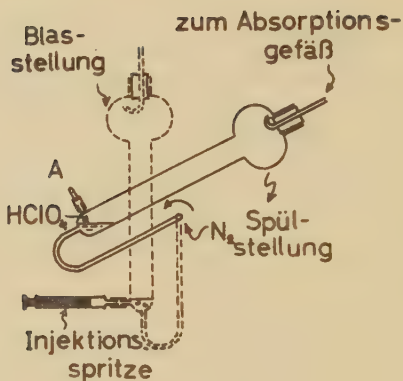


Abb. 41

auf die vorgelegte Säure gedrückt, das Gefäß in "Blas-stellung" senkrecht gedreht und der Schwefelwasserstoff in die Vorlage getrieben. Durch wiederholtes Ansaugen und Ausstoßen konnte die Spritze mehrmals gründlich aus-
gespült werden.

Versuch a) (vergl. Tab.9)

Ansatz:

1,15 mMol Tris/HCl pH 8

30 μ g Pyridoxalphosphat

3 μ Mol K-Trilonat pH 8

10-50 μ Mol l-Cystein-Hydrochlorid

Enzym

Startvol. 12 ml. Nach 0,2,4,6,8,10,18,20 Std.
wurden jeweils 0,1 ml En-
zymlösung (1250 Enz.-Einh.
nach DEAE-Cellulose spez.
Akt. 900) einpipettiert.

Temp. 37°C.

Versuch b) (Die in Klammern angegebenen Ziffern beziehen sich auf Tabelle 10, Spalte 1).

Ansatz:

40 μ Mol l-Cystein-Hydrochlorid

40 μ Mol NaOH

25 γ Pyridoxalphosphat

2,5 μ Mol K-Trilonat pH 8

75 μ Mol Tris/HCl pH 8

0 bzw. 1000 Enzym-Einheiten (3)

0 bzw. 6,5 μ Mol l-Serin (als d-l-Serin)(1),(2)

Vol 0,8 ml, Temp. 37°C, Inkub.-Zeit: 3 Std.

Stop mit 0,2 ml 70%iger HClO_4

Versuch c) Ansatz wie bei Versuch b)

Variation: Enzymmenge (0-2000 Enz.-Einh.(4)-(8)

Versuch d) Ansatz wie bei Versuch b)

Variation: ohne Cystein (9), (10),

Inkub.-Zeit: 4 bzw. 4,5 Std. {11},

Brenztraubensäuretest nega- {12}
tiv.

Versuch e) Ansatz wie bei Versuch b)

Variation: Enzympräparat F (13) und (14)

D1 (15)

In einer Parallelprobe von (15)

war der Brenztraubensäuretest
ebenfalls negativ.

Versuch f) Ansatz wie bei Versuch b) jedoch

20 μ Mol Cystein-Hydrochlorid

750 μ Mol Tris/HCl pH 8

Stop mit 0,5 ml 70%iger HClO_4

Variation: Enzymmenge (16) - (21)

Versuch g) Halber Ansatz von Versuch f)
Enzympräparat F, 4000 Enz.-Einh./Ansatz
Variation: Serinkonzentration (22) - (26)

Versuch h) Wiederholung von Versuch g) (24)-(26) :
(27),(28) und (29)
vergl. Abb. 33

Versuch i) Ansatz wie bei Versuch g)
Variation: Serinkonzentration
Bestimmung von H_2S u n d Serin (30)-(32)

D. Zusammenfassung

=====

β -Methyl-Crotonyl-Carboxylase das Enzym, das die Reaktion



katalysiert, wurde aus Microorganismen isoliert, die das Enzym durch Adaptation auf ein elektives Nährmedium in besonders hohem Maße gebildet hatten.

Mit einer gewissen Vorreinigung nach klassischen Methoden der Eiweißtrennung und zwei chromatographischen Reinigungsschritten konnte eine 170-180fache Anreicherung der β -Methyl-Crotonyl-Carboxylase aus Extrakten von *Mycobacterium* spp erzielt werden. DEAE-Cellulose als Adsorbens bewährte sich erneut, vor allem in Kombination mit Hydroxylapatit, einem zweiten in den letzten Jahren entwickelten Trägermaterial. Die Ausbeute von 36% zeigt die Brauchbarkeit dieser modernen Fraktionierverfahren.

Bei der Reinigung der β -Methyl-Crotonyl-Carboxylase an Austauschern trat das Problem der Dialyse großer Volumina stark verdünnter Proteinlösungen und deren Konzentration auf. Systematische Versuche und die Lösung dieser Aufgabe werden beschrieben.

Ein in den letzten Jahren in schwedischen Laboratorien ausgearbeitetes Verfahren zur Elektrophorese im Dichtegradienten wurde in Hinblick auf seine Verwendbarkeit bei der Anreicherung der β -Methyl-Crotonyl-Carboxylase methodisch studiert. Während orientierender Elektrophoreseversuche mit Humanserum konnte eine neue Vorrichtung entwickelt werden, die es gestattet, auch mit Lösungen ver-

schiedener Dichte übersichtliche Konzentrationsgradienten zu erzeugen. Die Elektrophorese bewährte sich jedoch nicht bei der Anreicherung der β -Methyl-Crotonyl-Carboxylase aus Bakterienprotein.

Das Verfahren zur Gewinnung der β -Methyl-Crotonyl-Carboxylase aus *Mycobacterium* spp konnte an derselben Bakteriencharge mehrfach reproduziert werden, nicht aber an zwei weiteren großen Ansätzen. Vermutlich infolge einer Degeneration der Bakterienkulturen verloren hier die Enzymlösungen so rasch an Carboxylaseaktivität, daß eine Isolierung des Enzyms auch unter Anwendung anderer Reinigungsmethoden nicht möglich war. Aus diesem Grunde wurde als Ausgangsmaterial ein neuer Microorganismus gewählt.

Ein aus Rinderpansen isolierter *Pseudomonas*-Stamm, der unter praktisch gleichen Bedingungen gezüchtet wurde, lieferte aktivere, vor allem aber beständige Extrakte. Mit einer doppelt so hohen Ausgangsaktivität waren durch eine ähnliche Folge von Reinigungsschritten nach 35facher Anreicherung 38% der Aktivität der besten *Mycobacterien*präparate erreicht.

Das Hauptziel dieser Reinigungsmaßnahmen war die Abtrennung der Enzyme, die der Aufklärung des Katalysemechanismus im Wege standen, bei dem man die Beteiligung von Biotin vermutete. Es gelang, das β -Hydroxy- β -Methyl-Glutarsäure-spaltende Enzym aus *Mycobacterium*präparaten vollständig zu beseitigen. Die *Pseudomonas*präparate konnten darüber hinaus schließlich auch frei von ATP-hydrolysierenden Enzymen, DPNH-Oxydasen und Myokinase erhalten werden.

Die biochemische Funktion des VitaminH (Biotin) wurde, nachdem die Parallelität von enzymatischer Aktivität und Biotingehalt nachgewiesen worden war, mit Hilfe der hochgereinigten Enzympräparate klargestellt. Biotin übernimmt als Wirkungsgruppe des Enzyms die Aktivierung

der Kohlensäure. Die wesentlichen Strukturmerkmale des aktiven Carbonates konnten aufgezeigt werden (LYNEN, KNAPPE und Mitarbeiter).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die früher ausgeführte Anreicherung eines Enzyms aus Bierhefe mit den neugewonnenen Erfahrungen aufgegriffen. Es handelt sich um die Serinsulphydrase, ein Enzym des Schwefelstoffwechsels, das die Reaktion



beschleunigt.

Die Kombination von Reinigungsschritten: Chromatographie an DEAE-Cellulose und Hydroxylapatit führte zu einer zusätzlichen etwa 3fachen Anreicherung, so daß die Enzymaktivität rund 2000fach höher war als die des rohen Hefeextraktes. Trotz der immernoch niedrigen Wechselzahl der Enzympräparate konnte gezeigt werden, daß man ein Gleichgewicht annehmen muß, das weitgehend auf der Seite des Cysteins liegt.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

=====.

- 1) Svensson H., Valmet E. Science Tools (The LKB Instrument Journal) 2, 11 (1955)
- 2) Svensson H., Hagdahl L., Lerner K.D. ebenda 4, 1 (1957)
- 3) Cramer R., Lerner K.D., Polson A. ebenda 4, 17 (1957)
- 4) Svensson H. ebenda 5, 37 (1958)
- 5) Berg R.L., Beeler R.G. Ana.Chem. 30, 126 (1958)
- 6) Tiselius A., Arkiv Kemi 7, Nr.49, 443 (1954)
- 7) Tiselius A., Angew.Chem. Nr.9/10 (1955)
- 8) Main R.K., Cole L.J. Arch.Biochem. Biophys. 68, 186 (1957)
- 9) Tiselius A., Hjertén S., Levin Ö. Arch. Biochem. Biophys. 65, 132 (1956)
- 10) Hjertén S. Biochim. Biophys. Acta 31, 216 (1959)
- 11) Mahler H. J.Biol.Chem. 233, 230 (1958)
- 12) Sober H.A., Peterson E.A., J.Am.Chem.Soc. 76, 1711 (1954)
- 13) Peterson E.A., Sober H.A. J.Am.Chem.Soc. 78, 751 (1956)
- 14) Sober H.A., Gutter F.J., Wyckoff M.M., Peterson E.A. J.Am.Chem.Soc. 78, 756 (1956)
- 15) Sober H.A., Peterson E.A. Fed.Proc. 17, 1116 (1958)
- 16) Sober H.A., Peterson E.A. in "Ion Exchangers in Organic and Biochem." Herausg.Calmon C. und Kressman T.R.E. Interscience Publ.Inc. New York 1957
- 17) Schlossmann K. Dissertation, Universität München 1957
- 18) Lorch E. Diplomarbeit, Universität München 1958
- 19) Knappe J. Dissertation Universität München 1957
- 20) Flavin M. Fed.Proc. 14, 211 (1955)
- 21) Flavin M., Ortiz P.J., Ochoa S. Nature (London) 176, 823 (1955)
- 22) Wakil S.J., J.Am.Chem.Soc. 80, 6465 (1958)
- 23) Formica J.V., Brady R.J.Am.Chem.Soc. 81, 752 (1959)
- 24) Lynen F.Cell. and Comp. Physiol.Sup. 1 V.54, Dec.1959 S. 33 - 50
- 25) Delwiche E.A., Phares E.F., Carson S.F. Fed.Proc. 12, 194 (1953) 13, 198 (1954)
- 26) Flavin M., Castro-Mendoza H., Ochoa S. Biochim. Biophys. Acta 20, 591 (1956)

- 27) Coon M.J. Fed.Proc. 14, 762 (1955)
- 28) Bachhawat B.K., Coon M.J. J.Am.Chem. Soc. 79, 1505 (1957)
- 29) Kögl F. Ber. Deutsche Chem.Ges. 68, A 16 (1935)
- 30) Kögl F., Tönnes B. Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 242, 43 (1936)
- 31) György P., Melville D.B., Burk D., Du Vigneaud V. Science (Washington) 91, 243 (1940)
- 32) Eakin R.E., Snell E.E., Williams R.J. J.Biol.Chem. 136, 801 (1940) 140, 535 (1941)
- 33) Plaut G.W.E., Lardy H.A. J.Biol.Chem. 186, 705 (1950)
- 34) Fischer J.E. Proc.Soc.exp. Biol.Med. 88, 227 (1955)
- 35) Coon M.J., Gurin S. J.Biol.Chem. 180, 1159 (1949)
- 36) Coon M.J. J.Biol.Chem. 187, 71 (1950)
- 37) Bachhawat B.K., Robinson W.G., Coon M.J. J.Am.Chem. Soc. 76, 3098 (1954)
- 38) Bachhawat B.K., Robinson W.G., Coon M.J. J.Biol.Chem. 219, 539 (1956)
- 39) Woessner J.F., Bachhawat B.K., Coon M.J., J. Biol.Chem. 233, 520 (1958)
- 40) Merckenschlager M., Schlossmann K., Kurz W. Biochem.Z. 329, 332 (1957)
- 41) Hirs C.H.W., Moore S., Stein W.H. J.Biol.Chem. 200, 493 (1953)
- 42) Warburg O. in "Wasserstoffübertragende Fermente", Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase W.Saenger Verlag, Berlin 1948
- 43) Stadtman E.R. J.Biol.Chem. 196, 527 (1952)
- 44) Lynen F., Knappe J., Lorch E., Jütting G., Ringelmann E. Angew.Chem. 71, 481 (1959)
- 45) Korkes S., del Campillo A., Gunsalus I.C., Ochoa S. J.Biol.Chem. 193, 721 (1951)
- 46) Cherkin A., Martinez F.E., Dunn M.S. J.Am.Chem.Soc. 75, 1244 (1953)
- 47) Lis H. Biochim.Biophys. Acta 28, 191 (1958)
- 48) Bücher Th. Biochim.Biophys. Acta 1, 292 (1947)
- 49) Kohn J. Nature (London) 183, 1055 (1959)
- 50) Stauffer R.E., in Weissberger A.: "Technique of Organic Chemistry" Intersc.Pul. Inc. New York 1950 V.III, 313
- 51) Kunitz M., Simms H.S. J.General Physiol. 11, 641 (1928)

- 52) Lichstein H.C. J.Biol.Chem. 212 217 (1955)/Fed.Proc. 16,
211 (1957)
- 53) Warburg O., Christian W. Biochem.Z. 310, 384 (1943)
- 54) Brakke M.K. Phytopathology 43, 467 (1953)
- 55) Brakke M.K. Arch.Biochem.Biophys. 55, 175 (1955)
- 56) Brakke M.K., Vatter A.E., Black L.M. in "Abnormal and
Pathological Plant Growth" S.137-156
Brookhaven National Laboratory Upton,
New York 1954
- 57) Kolin A. J.Chem.Phys. 22, 1628 (1954)
- 58) Kolin A. Proc. Nat. Acad.Sci.U.S. 41, 101 (1955)
- 59) Kolin A. J.Chem.Phys. 23, 407 (1955)
- 60) Ericson L.E., Nihlén H. Acta Chim.Scand. 7, 980 (1953)
Science Tools 1, 14 (1954)
- 61) Brakke M.K. J.Am.Chem.Soc., 73, 1847 (1951)
Arch.Biochem.Biophys. 45, 275 (1953)
- 62) Anderson N.G. Rev.Sci. Instr. 26, 891 (1955)
- 63) Kahler H., Bryan W.R., Lloyd Jr.B.J., Moloney J.B.
J.Nat.Cancer Inst. 15, 331 (1954)
- 64) Bock R.M., Ling N.S. Anal.Chem. 26, 1543 (1954)
- 65) Paul K.G. Acta Chim.Scand. 12, 1312 (1958)
- 66) Dalziel K. Acta Chim.Scand. 12, 459 (1958)
- 67) Porath J.Arkiv Kemi 11, 97 (1957)
- 68) Grunert R.R., Philips P.H. Arch.Biochem.Biophys. 30, 217
(1951)
- 69) Dixon M., Webb E.C. "Enzymes" Longmans, Green and Co.
Ltd. London 1958
- 70) Budd M.S., Bewick H.A. Anal.Chem. 24, 1536 (1952)
- 71) Kubowitz F., Ott P., Biochem.Z. 314, 94 (1943)
- 72) Smythe C.V. J.Biol.Chem. 142, 387 (1942)
- 73) Hilz H., Knappe J., Ringelmann E., Lynen F. Biochem.Z.
329, 476 (1958)
- 74) Beisenherz G., Boltze H.J., Bücher Th., Czok R., Garbade
K.H., Meyer-Arendt E., Pfeleiderer G.
Z. Naturforsch. 8 b, 555 (1953)
- 75) Kalckar H.M. J.Biol.Chem. 167, 461 (1947)
- 76) Neurath H., Bailey K. in "The Proteins" Acad.Press
Inc.Publ. New York 1953 Vol I A, S.54

- 77) Alm R.S., Williams R.J.P., Tiselius A. Acta Chim.Scand.
6, 826 (1952)
- 78) Fritz J.S., Freehand M.Q. Anal.Chem. 26, 1953 (1954)
- 79) Heppel A.L. in "Methods in Enzymology" Vol.II, S.572
- 80) Keilin D., Hartee E.F. Proc.Roy.Soc. London B 124,
397 (1938)

Lebenslauf

=====

Am 18. November 1931 wurde ich in München als Sohn des Dipl. Landwirtes Max Lorch und seiner Ehefrau Paula, geb. Endres geboren.

Von April 1938 bis Juni 1942 besuchte ich die Volksschule und anschließend mit kriegsbedingter Unterbrechung die Wittelsbacher Oberschule in München. Im Sommer 1951 schloss ich dort mit der Reifeprüfung meine Schulzeit ab.

Im Wintersemester 1951 begann ich an der Universität München mit dem Studium der Chemie. Im November 1954 legte ich die Diplom-Vorprüfung und im Februar 1957 die Diplom-Hauptprüfung für Chemiker ab. Von Mai 1957 bis Mai 1958 führte ich die Diplomarbeit über das Thema "Die Anreicherung der Serinsulphhydrase in präparativem Maßstab" und anschließend die Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn Prof.Dr. F.Lynen aus.

